

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004年4月8日 (08.04.2004)

PCT

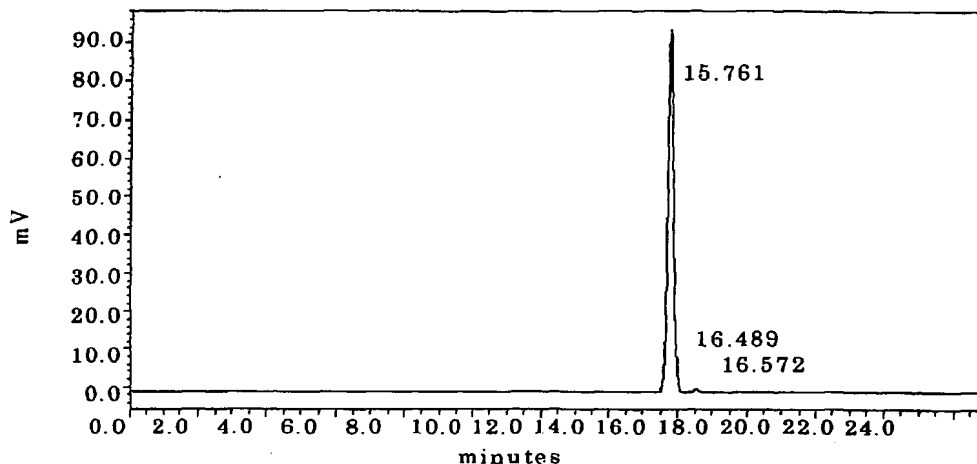
(10) 国際公開番号  
WO 2004/029080 A1

- (51) 国際特許分類: C07K 7/02, A61K 38/00, 49/00, 51/00, A61N 5/10, A61P 37/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/012362
- (22) 国際出願日: 2003年9月26日 (26.09.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2002-282229 2002年9月27日 (27.09.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日本メジフィジックス株式会社 (NIHON MEDI-PHYSICS CO., LTD.) [JP/JP]; 〒662-0918 兵庫県 西宮市 六湛寺町9番8号 Hyogo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 関 育也 (SEKI, Ikuya) [JP/JP]; 〒299-0266 千葉県 袖ヶ浦市 北袖3番地1 日本メジフィジックス株式会社 創業研究所内 Chiba (JP). 川口 敬義 (KAWAGUCHI, Takayoshi) [JP/JP]; 〒299-0266 千葉県 袖ヶ浦市 北袖3番地1 日本メジフィジックス株式会社 創業研究所内 Chiba (JP). 白神 宜史 (SHIRAKAMI, Yoshifumi) [JP/JP]; 〒299-0266 千葉県 袖ヶ浦市 北袖3番地1 日本メジフィジックス株式会社 創業研究所内 Chiba (JP).
- (74) 代理人: 浅村 皓, 外 (ASAMURA, Kiyoshi et al.); 〒100-0004 東京都 千代田区 大手町2丁目2番1号 新大手町ビル331 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,

[続葉有]

(54) Title: COMPOUND BINDING TO LEUKOCYTES AND MEDICINAL COMPOSITION CONTAINING THE COMPOUND IN LABELED STATE AS THE ACTIVE INGREDIENT

(54) 発明の名称: 白血球結合性化合物およびその標識化合物を有効成分とする医薬組成物



Tc99m-ペプチド4のHPLCチャート

HPLC CHROMATOGRAM OF Tc99m-PEPTIDE 4

(57) Abstract: A compound binding to leukocytes, which comprises Met or Nle-Leu-Phe serving as the leukocyte-binding site of a formyl peptide receptor (FPR), a binding part comprising Ser or Thr elevating the binding ratios to monocytes and lymphocytes in all leukocytes, a group which can be labeled with a radioactive metal or a paramagnetic metal, and a spacer binding them shows binding properties specific to all leukocytes, i.e., neutrophilic leukocytes, monocytes and lymphocytes both *in vivo* and *in vitro* and

[続葉有]



LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI,  
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,  
SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

can be labeled with a radioactive metal or a paramagnetic metal. Owing to these characteristics, this compound is highly useful in SPECT image diagnosis, PET image diagnosis, MRI image diagnosis and so on wherein imaging is performed in a site with vigorous leukocyte infiltration accompanied by an immune reaction in an individual.

(57) 要約: 白血球のホルミルペプチド受容体 FPR との結合部位である Met または N I e - L e u - P h e -, 全白血球中の単球、リンパ球への結合率を向上させる S e r または T h r からなる結合部分、放射性金属または常磁性金属で標識可能な基、およびこれらを結合する役割を荷うスパーサーから構成される白血球結合性化合物は、生体内外ですべての白血球、すなわち好中球、単球、リンパ球に対して特異的な結合性を示し、かつ放射性金属または常磁性金属で標識可能であり、従って個体の免疫応答反応を伴う白血球浸潤の盛んな部位のイメージングを行う SPECT 画像診断、PET 画像診断、MRI 画像診断などに極めて有用である。

## 明 細 書

白血球結合性化合物およびその標識化合物を有効成分とする医薬組成物

## 5 技術分野

本発明は、個体の免疫応答反応を伴う疾患を診断もしくは治療するにあたり、異常部位を標的化すると共に、その活動性状態を的確に把握するための白血球結合性化合物とその標識化合物を有効成分とする医薬品組成物に関する。更に詳細には、本発明は生体内および生体外で白血球に対して特異的な結合性を示す化合物であって、放射性金属および常磁性金属によって標識可能であって、哺乳動物体内の感染症、炎症、癌およびアテローム性動脈硬化症の病巣部位を含めた、病理学的病巣部位をイメージするのに有用な新規な白血球結合性化合物、およびその標識化合物を有効成分とする、放射性診断、SPECT画像診断、PET画像診断、MRI画像診断あるいは放射性治療などに有用な医薬組成物に関する。

15

## 背景技術

ヒトを含めた動物は、その個体を取り巻く環境から生命維持活動に影響を及ぼす因子の作用を絶えず受けている。その影響を及ぼす因子には大気や太陽光、食物といった正の作用をもたらすものの他に、微生物の侵襲、有害化学物質、熱、放射線などの負の作用をもたらす因子もある。その負の作用を持つ因子の影響に対し、個体は生命活動を維持させようと様々な防御機構を働かせ対処している。

この防御機構は生物学的には免疫と定義され、免疫に関わる生体内反応を免疫応答反応と言う。その反応を引き起こすものとしては、細菌やマイコプラズマなどの微生物、ウイルス、生体組織もしくは器官の異種移植片、有害化学物質、高温な熱、過度な冷却、高エネルギーをもった放射線、電氣的あるいは物理的な組織障害などが知られている。免疫応答反応は炎症反応を含めた個体の「自己」と「非自己」の認識の結果において起こる生体反応であり、発熱、白血球活性化と移動、「自己」以外全ての除去反応など広義の防御機構の作用であり、炎症反応は個体に侵入した異物の除去、侵された組織の破壊、破壊された組織の修復とい

った免疫応答反応の一部の結果において起こる現象である。

免疫応答反応における重要な因子の一つとして白血球が挙げられる。組織は浸潤する白血球種を特定したり、その程度や期間を調節したりする様々なメディエーターを産出し、また血液を含む体液中に存在するメディエーターや他の分子と結合して応答し得る様々な受容体をそれら細胞膜表面上に有する。受容体は対応するメディエーターと結合することによりその白血球を活性化し、白血球の種別により種々の異なる受容体が発現する、その結果、組織へ浸潤する白血球の種類は存在するメディエーターにより規定される。

一般に炎症などの局所の免疫応答は、組織を破壊する何らかの刺激を受けた後、数時間程度は補体などの免疫関連蛋白質がその刺激の除去に対処する。その後補体の分解物や破壊を受けた組織から放出されるサイトカインなどのメディエーターが血液などの体液に放出され、好中球を主とする顆粒球が受容体を介して活性化され、組織への浸潤をメディエーターの密度勾配を基に開始する。このときのメディエーターは一般的に走化性因子と呼ばれる。顆粒球の浸潤は最初の刺激を受けてから通常十数時間でピークを迎える。続いて単球由来を中心としたマクロファージの浸潤が徐々に増え、顆粒球と共に、刺激を起こす元を取り除く。傷害を受けた組織のほか、活性化された顆粒球やマクロファージからもサイトカインなどが放出され、抗体産生などの免疫応答反応を効率的に行うことのできる、あるいは破壊された組織を修復できる、あるいは免疫応答反応を制御できるT細胞やB細胞などからなるリンパ球の浸潤が、その後増加し、最初の刺激を受けてから通常数十時間でピークを迎える。

こうした免疫応答反応は個体の生命活動を維持していく上で、極めて大切な作用であるのだが、生命活動の維持を目的とした場合、個体によるその反応の制御が不完全である点において、時には致命的な負の作用をおよぼす。その代表的な事象が自己免疫疾患と呼ばれる疾患群の発症である。この疾患群には、アトピー性皮膚炎、慢性関節リウマチ、ベーチェット病、全身性エリテマトーデス、潰瘍性大腸炎、クローン病、橋本病、そのほか膠原病などの疾患が知られている。感染症などの異物の侵襲や火傷などの組織破壊のような炎症では、原因がそれぞれ特定されているが、これら自己免疫疾患は特定された原因因子がないかもしくは

未だ見出されておらず、原因不明の難病である。しかしながら、これら疾患群に共通して起こる現象は各疾患固有の組織への白血球の浸潤、特にリンパ球や単球およびマクロファージであることが周知の事実である。

このように自己免疫疾患や慢性化した炎症および感染症ではリンパ球や単球が  
5 免疫応答反応における白血球浸潤の中心であり、また普遍的である。したがって、リンパ球や単球および好中球を含む白血球の浸潤の有無を検索あるいは検出しその程度を的確に把握することが、効果的な治療を施し、無駄な投薬等を避け患者の精神的苦痛や費用負担の軽減および医療保険における費用軽減を行う上で極めて重要である。

10 そこで、白血球の浸潤の有無を検索あるいは検出しその程度を的確に把握するには画像診断が有用であることから、核医学においては種々の放射性薬剤及びその使用が研究された。

ガリウム-67 ( $^{67}\text{Ga}$ ) クエン酸塩は、炎症シンチグラフィー薬剤として古くから用いられている（例えば、Ebright, JR. et al., Arch. Int. Med.,  
15 142, 246-254 (1982) 参照）。しかし、この化合物は感染症または炎症の部位に特異的でない。また、 $^{67}\text{Ga}$  のガンマ線の放射エネルギーは、通常のガンマカメラにおいて良好な画像を得るためには十分には適していない。さらに、放射性薬剤の注射からイメージングまでに72時間程度の待機時間が必要である。

感染部位をイメージングする核医学的方法として、次に、In-111 標識白血球（以下 $^{111}\text{In}$ -白血球）（例えば、Peters, AM. et al., J. Nucl. Med.,  
20 33, 65-67 (1992) 参照）が用いられた。Thakurらは、生体外における好中球の放射性核種標識とその利用を広範囲にわたり分析して論じている（Sem. Nucl. Med., 14, 10-17 (1984)）。この方法では、個体の好中球を生体外でインジウム-111（以下In-111）で標識し、その標識好中球を生体外における動力学的研究に、また個体における急性期の炎症性病巣の画像化に使用すること  
25 ができる。

しかし、 $^{111}\text{In}$ -白血球を用いる際、放射性標識化合物の調製が、自己血液の滅菌取出、白血球の血液からの滅菌単離、白血球の滅菌標識および放射性核種標識白血球を患者へ再注射する各段階を要し、この調製には2時間以上というか

かなりの時間が必要である。また、最適イメージ画像を得るには、この標識白血球の再注射から撮像までに12ないし48時間の待機が必要と考えられている。さらに、通常イメージング検討にて実施される白血球数 $1 \times 10^7$ 個あたり200  $\mu\text{Ci}$ という放射エネルギーにおいて、 $^{111}\text{In}$ の放出放射エネルギーが強いために、白血球種のうち好中球を主とした顆粒球は標識に耐えうるが、リンパ球などは標識後直ちに死滅してしまう (Chianelli, M. et al., Nucl. Med. Comm., 18, 437-455 (1997)) ために、リンパ球および単球の動態をモニターすることが困難である。さらにまた、被曝線量の見地から投与できる放射エネルギーが制限される結果、イメージの質が悪くなることが多い。

次に、開発された Tc-99m 標識白血球は、上記  $^{111}\text{In}$ -白血球で問題であった撮像までの待機時間を短縮でき、かつリンパ球および単球の動態をモニターすることが可能で、さらに  $\text{In-111}$  よりもかなり多い放射エネルギーを投与することができる（例えば、Vorne, M. et al., J. Nucl. Med., 30, 1332-1336 (1989) 参照）。しかし、標識安定性が劣るために、非標的の代謝臓器への蓄積が問題となる。また長い調製時間と血液の取り扱いの問題は、 $^{111}\text{In}$ -白血球と変わらない (Chianelli, M. et al. Nucl. Med. Comm., 18, 437-455 (1997))。

単球、好中球、顆粒球その他を含めたヒト白血球に対して結合性を示す放射性核種で標識されたモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体についても開発の試みが行われている。例えば、 $^{99m}\text{Tc}$  標識抗顆粒球モノクローナル抗体（例えば、Lind, P. et al., J. Nucl. Med., 31, 417~473 (1990) 参照）および  $^{111}\text{In}$  標識非特異的ヒト免疫グロブリン ( $^{111}\text{In}$ -HIG、例えば、LaMuraglia, GM. Et al., 1989, J. Vasc. Surg., 10, 20~28 (1989) 参照) は、感染によって起こった炎症の検出について検討を行っている。 $^{111}\text{In}$ -HIG は、投与と最適イメージ撮像との間に 24~48 時間を要する点で  $^{111}\text{In}$ -白血球と同様の短所を有する。

また、 $^{111}\text{In}$ -HIGは、炎症部位に集積し、それを描出することが可能とされる（例えば、Rubin, R. et al., J. Nucl. Med., 29, 651-656 (1988)）が、その集積機序は炎症部位へ浸潤する白血球細胞表面上に存在するFc受容体に結合することにより、炎症部位へ集積するとする考え方（Fischman, A. et al., J.

Nucl. Med., 31, 1199-1205 (1990)) と、白血球浸潤とは別に、アルブミンなどの蛋白質などと同じような血管透過性亢進による血管外漏出によるものとする考え方 (Morrel, E. et al., J. Nucl. Med., 30, 1538-1545 (1989)) とがある。

その他の蛋白質を用い、白血球に対して結合作用を示す生体分子を用いた検討もこれまでに報告されている。

van der Laken, C J. らは放射性ヨウ素で標識した炎症性サイトカインであるインターロイキン 1 を報告している (van der Laken, C J. et al., European J. Nucl. Med., 22, 1249-1255 (1995)) 。

Signore らは放射性ヨウ素標識した炎症性サイトカインであるインターロイキン 2 を用いた慢性炎症疾患に対する検討を報告している (Signore, A. et al., Nucl. Med. Comm., 13, 713-722 (1992)) 。

Hay R V. らは放射性ヨウ素標識した炎症性サイトカインであるインターロイキン 8 を用いた化学起炎炎症に対する検討を報告している (Hay R V. et al., Nucl. Med. Comm., 18, 367-378 (1997)) 。

これらの放射性標識化合物は、感染症などの急性炎症、あるいは自己免疫疾患などの慢性炎症を描出することに成功している。

しかしながらこのような蛋白質や抗体は、分子量が大きいという点において、急性炎症にみられる血管透過性亢進による血液成分の血管外漏出が問題となる

(Roitt. I. et al., Essential Immunology, 8<sup>th</sup> edn. Oxford, Blackwell Scientific (1994)) 。分子量 2 0 0 0 程度の分子は、血管外に漏出してもその場に長く留まることはないのだが、アルブミン (分子量約 6 4 0 0 0) などの蛋白質は、その分子の大きさのために、低分子よりも留まりやすく、炎症特異的な集積かの判断が難しい (Morrel, E. et al., J. Nucl. Med., 30, 1538-1545 (1989)) 。

小さくて、容易に合成できる分子が、日常的に用いる放射性薬剤として好ましい。全血中の白血球に対して選択的に標識することが可能で、患者に直接注射でき、かつ白血球が蓄積する部位を位置決定することによって感染症および炎症の病巣部位をイメージングすることが可能となる低分子量の合成化合物として、放射性核種標識ペプチドが適当と考えられる。

例えば、Moyerらは、ヘパリンなどの多硫酸化グリカンと結合する血小板第4因子（PF-4）カルボキシル末端のペプチドを利用した化合物をTc-99m標識し、炎症に対する集積性について報告している（Moyer, BR. et al., J. Nucl. Med., 37, 673-679 (1996)）。この化合物（PF-4 ペプチドヘパリン）  
5 はTc-99mキレートアミノ酸配列を含む23残基のペプチド（分子量約2600）にヘパリン（分子量約7,000から25,000）が結合した様式を取っており、一つの分子としてその分子量が約1万から3万程度になる。

PF-4 ペプチドヘパリンも蛋白質と同様に分子量が大きいという点で、白血球浸潤部位への集積のみを表す製剤とはいえず、血管透過性亢進による非特異的  
10 集積が少ない低分子量の化合物を用いた、真に白血球浸潤のみを表す製剤が必要とされていた。またヘパリンの使用は、ヘパリンが持つ生理的作用により、その使用が制限される場合がありうる。

Dahlman, T. ら、あるいはRinge, J D. らは、ヘパリンの副作用として、ヘパリン投与による骨密度の低下および長期投与による骨粗鬆症の発症  
15 の危険性を報告している。（Br. J. Obstet Gynaecol 1990 Mar, 97, 3, 221-228 および Ringe et al., Geburtshilfe Frauenheilkd., 52, 7, 426-429 (1992)）。その他にも、抗トロンビン作用、トロンボプラスチンの生成抑制、血小板の凝集抑制などのヘパリンが持つ生理的作用により、副作用のおそれがあり、あるいは、出血している場合や出血する可能性のある疾患、重篤な肝障害・腎障害がある場合  
20 は慎重な処置が必要であるなどの使用上の注意点が多い。

その他の放射性核種標識ペプチドによる検討では、ホルミルメチオニルロイシルフェニルアラニル（fMLF）含有ペプチドが従来技術において報告されている。

Dayらは、<sup>125</sup>Iで放射性核種標識した走化性ホルミル化ペプチド（fMLF）  
25 F）を報告している（Day, AR. et al., FEBS Lett. 77, 291-294 (1977)）。

Jiangらは、<sup>125</sup>Iで放射性核種標識した走化性ホルミル化ペプチド（fMLF）が生体内で炎症に集積することを報告している（例えば、Jiang, MS. et al., Nuklearmedizin, 21, 110-113 (1982)）。

Fishmanらは、DTPAを介した<sup>111</sup>In標識走化性ホルミル化ペプチ



ド (fMLF) を開示している (特許第 2931097 号明細書参照)。

Verbekeらは、メルカプトアセチルグリシルグリシンを介したTc-99m標識走化性ホルミル化ペプチド (fMLF) に関する報告をしている (例えば、Verbeke, K. et al., Nuclear Medicine & Biology, 27, 769-779 (2000)

5 参照)。

Baidooらは、ジアミノジチオール化合物を介したTc-99m標識走化性ホルミル化ペプチド (fMLF) に関する報告をしている (Baidoo, K. E. et al., Bioconjugate Chemistry, 9, 208-217 (1998)参照)。

また、放射性核種標識走化性ホルミル化ペプチド (fMLF) の光親和性を介して身体外で白血球を放射性核種標識するための使用に関する報告もある (例えば、米国特許第 4,986,979 号明細書参照)。

さらにまた、放射性核種標識可能な走化性ホルミル化ペプチド (fMLF) に関する報告もある (例えば、米国特許第5,792,444号明細書参照)。

走化性ホルミル化ペプチド (fMLF) はホルミル化ペプチド受容体 (以下、  
15 受容体FPR) を介して介して白血球に結合するとされ (Niedel, J. E. et al., Science, 205, 4413, 1412-1414 (1979))、受容体FPRを発現した白血球は好中球および単球であるとされる (Lewis, SL. et al., Inflammation, 4, 363-375 (1983))。

ヒトの血液中に存在する白血球の正常な組成は約50%が好中球、10%が単  
20 球とされる。単球は、好中球の5分の1以下でしかないために、これまでに知られている走化性ホルミル化ペプチドのアナログ体数種が結合する白血球は顆粒球が殆どであり、リンパ球および単球には弱い結合でしかないという知見が報告されている (Verbeke, K. et al., Nucl. Med. Biol., 27, 769-779 (2000))。

また好中球の浸潤が盛んな菌の感染症などの急性炎症には、放射性核種標識走  
25 化性ホルミル化ペプチドは集積を示すもの (Babich, JW. et al., J. Nucl. Med., 34, 2176-2181 (1993)参照) の、慢性炎症とされる病変への集積を明らかにした報告はこれまでにない。

また、臨床上の診断において、核医学検査やMRI検査を含めた画像診断が必要とされるのは、インビトロ検査などの初期診断で判断の難しい症例や慢性化し

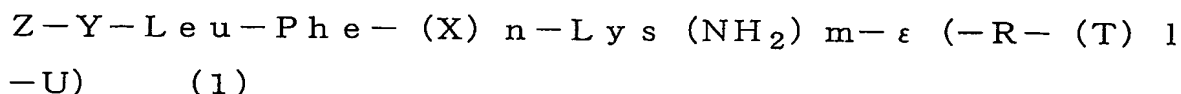
- た病変を伴った症例において多く使用されている。またこのような症例ではしばしばステロイド剤投与および白血球除去療法などの免疫応答および白血球浸潤を抑制する治療法が行われているために、慢性炎症を含めた免疫応答反応炎症病変を伴う疾患の画像診断が可能な、血管透過性亢進の影響を受けない低分子でかつ、
- 5 免疫応答反応および白血球浸潤を画像化することのできる製剤が望まれている。

ペプチドおよびポリペプチドを  $Tc-99m$  で標識する方法は既に知られている（例えば、特開平 8-231587 号公報参照）。

#### 発明の開示

- 10 本発明は、かかる従来技術の状況に鑑み、生体内外で白血球、すなわち好中球、単球、リンパ球等に対して特異的な結合性を示し、かつ放射性金属または常磁性金属で標識可能な化合物、該標識化合物を有効成分とする、個体の免疫応答反応を伴う白血球浸潤の盛んな部位のイメージングを行う SPECT 画像診断、PET 画像診断、MRI 画像診断あるいは放射性治療などに有用な医薬組成物を提供
- 15 することを目的とする。

すなわち、本発明は、下記式 (1)



- 20 (式 (1) 中、Z はアミノ基の保護基を表し；

Y は Met または Nle を表し；

(X)<sub>n</sub> において、X は 1 個もしくはそれ以上のアミノ酸および／または有機合成可能な化合物よりなるスペーサー、n は 1 または 0 を表し；

- (NH<sub>2</sub>)<sub>m</sub> において、NH<sub>2</sub> は Lys の α 位のカルボキシル基の保護基として
- 25 のアミド基、m は 1 または 0 を表し；

$\epsilon(-R-(T)_1-U)$  において、R は Lys の ε-アミノ基にアミド結合した Ser または Thr、T は 1 個もしくはそれ以上のアミノ酸および／または有機合成可能な化合物よりなるスペーサー、1 は 1 または 0、U は金属標識可能な基を表し；

但し、前記XとTは同じでも異なってもよい)

で表される白血球結合性化合物に関する。

さらに、本発明は、上記式(1)で表される白血球結合性化合物を放射性金属または常磁性金属で標識してなる標識化合物を有効成分とする医薬組成物に関する

5    るものである。

#### 図面の簡単な説明

図1は、Tc-99m-ペプチド4のHPLCクロマトグラムを示す。

図2は、Tc-99m-ペプチド6のHPLCクロマトグラムを示す。

10    図3は、Tc-99mペプチドのウサギ血液内分布を示す。

図4は、Tc-99m-ペプチド3のウサギ感染症モデルにおけるイメージを示す。左側が投与後2時間、右側が投与後22時間のイメージである。

図5は、Tc-99m-ペプチド4のウサギ感染症モデルにおけるイメージを示す。左側が投与後2時間、右側が投与後22時間のイメージである。

15    図6は、Tc-99m-ペプチド6のウサギ感染症モデルにおけるイメージを示す。左側が投与後2時間、右側が投与後22時間のイメージである。

図7は、Tc-99m-ペプチド8のウサギ感染症モデルにおけるイメージを示す。左側が投与後2時間、右側が投与後5時間のイメージである。

20    図8は、Tc-99m-ペプチド9のウサギ感染症モデルにおけるイメージを示す。左側が投与後2時間、右側が投与後5時間のイメージである。

図9は、Tc-99m-ペプチド12のウサギ感染症モデルにおけるイメージを示す。左側が投与後2時間、右側が投与後22時間のイメージである。

図10は、Tc-99m-ペプチド13のウサギ感染症モデルにおけるイメージを示す。左側が投与後2時間、右側が投与後5時間のイメージである。

25    図11は、Tc-99m-ペプチド14のウサギ感染症モデルにおけるイメージを示す。左側が投与後2時間、右側が投与後5時間のイメージである。

図12は、Tc-99m-ペプチド15のウサギ感染症モデルにおけるイメージを示す。左側が投与後2時間、右側が投与後5時間のイメージである。

図13は、Tc-99m-ペプチド16のウサギ感染症モデルにおけるイメー

ジを示す。左側が投与後 2 時間、右側が投与後 5 時間のイメージである。

図 1 4 は、T c - 9 9 m - ペプチド 1 7 のウサギ感染症モデルにおけるイメージを示す。左側が投与後 2 時間、右側が投与後 5 時間のイメージである。

図 1 5 は、T c - 9 9 m - ペプチド 1 8 のウサギ感染症モデルにおけるイメージを示す。左側が投与後 2 時間、右側が投与後 5 時間のイメージである。

図 1 6 は、各 T c - 9 9 m - ペプチドの正常ラットにおける尿排泄率の経時変化を示す。

図 1 7 は、各 T c - 9 9 m - ペプチドの正常ラットにおける小腸への集積の経時変化を示す。

10 図 1 8 は、T c - 9 9 m - ペプチドのヒト血液内分布を示す。

図 1 9 は、T c - 9 9 m 標識ペプチドのラット大腸炎モデル血液内分布を示す。

図 2 0 は、T c - 9 9 m 標識ペプチド 3 のラット大腸炎モデルにおけるイメージを示す。左側が投与後 3 0 分、右側が投与後 1 2 0 分のイメージである。

図 2 1 は、T c - 9 9 m 標識ペプチド 6 のラット大腸炎モデルにおけるイメージを示す。左側が投与後 3 0 分、右側が投与後 1 2 0 分のイメージである。

図 2 2 は、T c - 9 9 m 標識白血球のラット大腸炎モデルにおけるイメージを示す。左側が投与後 3 0 分、右側が投与後 1 2 0 分のイメージである。

図 2 3 は T c - 9 9 m 標識ペプチドのラット大腸炎モデルにおける炎症／臓器比を示す。

20 図 2 4 は、ラット大腸炎におけるペプチド 6 のオートラジオグラフィと免疫染色の画像を示す。左側がオートラジオグラフ、中央が顆粒球抗体免疫染色、右側が単球抗体免疫染色である。

図 2 5 は、ラット大腸炎におけるペプチド 1 4 のオートラジオグラフィと免疫染色の画像を示す。左側がオートラジオグラフ、中央が顆粒球抗体免疫染色、右側が単球抗体免疫染色である。

図 2 6 は、ラット大腸炎における T c - 9 9 m 標識白血球のオートラジオグラフィと免疫染色の画像を示す。左側がオートラジオグラフ、中央が顆粒球抗体免疫染色、右側が単球抗体免疫染色である。

図 2 7 は、ラット大腸炎における T c 9 9 m 標識ペプチドと T c 9 9 m 標識白

血球のオートラジオグラフィの炎症／正常組織比を示す。

図 28 は、リコンビナントヒト受容体と [3H]-FMLP の結合に対するペプチドの阻害率を示す。

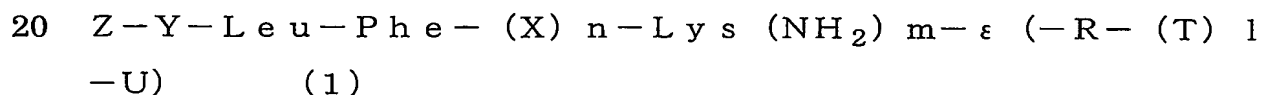
図 29 は、FMLP 阻害無しのウサギ感染症モデルにおける Tc-99m 標識ペプチド 6 のイメージを示す。左側が投与後 2 時間、右側が投与後 5 時間のイメージである。

図 30 は、FMLP 阻害有りのウサギ感染症モデルにおける Tc-99m 標識ペプチド 6 のイメージを示す。

## 10 発明の実施するための最良の形態

以下、本発明の実施の形態について説明する。なお、本明細書で用いるアミノ酸は全て一文字記号もしくは三文字記号で記し、特に断りのないかぎり左側を N 末端側、右側を C 末端側として表記した。アミノ酸に続くかっこ内は、特に断りのないかぎり側鎖に結合したペプチドならびに有機化合物を表すものである。また、かっこ内のアミノ酸配列は全体構造を把握しやすくするために、右側を N 末端側、左側を C 末端側として表記した。さらに、本明細書において、D 体のアミノ酸は D-アミノ酸と記載した。

本発明の白血球結合性化合物は、下記式 (1)



で表される。すなわち、白血球の受容体 FPR との結合部位 Z-Y-Leu-Phe-、全白血球中の単球、リンパ球への結合率を向上させる Ser または Thr からなる結合部分-R-、放射性金属、常磁性金属を標識可能な構造-U-、およびこれらを結合するスペーサー-(X)<sub>n</sub>-、-Lys(NH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-および-(T)l-よりなっている。

具体的には、下記のような白血球結合性化合物が好ましい態様として例示できる。

ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys(NH<sub>2</sub>)- $\epsilon$ -(Ser-Cys-Gly-Asn) ;

ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys(NH<sub>2</sub>)-ε (-Ser-Cys-Asp-Asp) ;

ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys(NH<sub>2</sub>)-ε (-Ser-Cys-Gly-Asp) ;

5   ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys(NH<sub>2</sub>)-ε (-Ser-D-Arg-Asp-Cys-Asp-Asp) ;

ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys(NH<sub>2</sub>)-ε (-Ser-1,4,8,11-テトラアザシクロテトラデカン-1,4,8,11-テトラ酢酸) ;

10   ホルミル-Nle-Leu-Phe-Lys(NH<sub>2</sub>)-ε (-Ser-D-Ser-Asn-D-Arg-Cys-Asp-Asp) ;

ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys(NH<sub>2</sub>)-ε (-Ser-D-Arg-ジエチレントリアミンペンタ酢酸) ;

15   ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys(NH<sub>2</sub>)-ε (-Ser-1,4,8,11-テトラアザシクロテトラデカン-酪酸) ;

ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys(NH<sub>2</sub>)-ε (-Ser-D-Arg-Asp-1,4,8,11-テトラアザシクロテトラデカン-酪酸) ;

20   ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys(NH<sub>2</sub>)-ε (-Ser-D-Ser-Asn-1,4,8,11-テトラアザシクロテトラデカン-酪酸) ;

アセチル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys(NH<sub>2</sub>)-ε (-Ser-D-Arg-Asp-Cys-Asp-Asp) ;

25   カルバミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys(NH<sub>2</sub>)-ε (-Ser-D-Arg-Asp-Cys-Asp-Asp) ;

メチル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys(NH<sub>2</sub>)-ε (-Ser-D-Arg-Asp-Cys-Asp-Asp)

を例示できる。

上記式(1)で示される白血球結合性化合物における受容体FPRとの結合部

位であるZ-Y-Leu-Phe-において、Zはアミノ基の保護基であって、例えば、ホルミル基、アセチル基などの炭素数1から9のアシル基、t-Boc基などの炭素数2から9のアシルオキシ基、メチル、エチル、プロピルなどの炭素数1から6の低級アルキル基、カルバミル基などが用いられる。YのMetや  
5 NleのN末端がホルミル基である場合、ホルミル化ペプチドを認識する白血球の受容体FPRに対し結合性を示し、ホルミル基よりも大きな分子構造をもつアセチル基やt-Boc基も同様に受容体への結合性を示す。

上記式(1)のZ-Y-Leu-Phe-において、Yはアミノ酸であるMetまたはNleを表す。白血球のうち、好中球ならびに単球の細胞膜上に恒常的  
10 に発現している受容体の一つにホルミル化ペプチドと強い結合性を示す受容体FPRが存在し、Metに対して結合性を示す。Metと空間的構造が極めて似ているNleもMetと同様の結合性を示す。

LeuおよびPheは、好中球ならびに単球に対する高い結合性を示す。ホルミル化ペプチドと強い結合性を示す受容体FPRは、ホルミル-Met、ホルミル-Met-Met、ホルミル-Met-Met-Leu、ホルミル-Met-Leu-Leuなどのペプチドに対しても結合性を示すがホルミル-Met-Leu-Pheが最も強い結合性を示す。  
15

本発明における最大の特徴は、上記式(1)におけるZ-Y-Leu-Phe-に、スペーサーであるX、および-Lys(NH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-のεアミノ基を介して結合したRであり、Rは水酸基を側鎖にもつアミノ酸であるSerまたはThrから選ばれる。このSerまたはThrの付加した金属標識可能な構造を利用することにより、従来の低分子の白血球結合性化合物ではみられなかった、リンパ球および単球への著明な結合が初めて可能になった。従来の受容体FPRとの結合部位Z-Y-Leu-Phe-単独からなるペプチドの白血球への結合は、  
20 好中球、単球への結合は見られるものの、リンパ球への結合は殆ど見られなかった。この受容体FPRとの結合部位Z-Y-Leu-Phe-と金属標識可能な構造とがLysのεアミノ基に結合したSerまたはThrをを介して結合することにより、単球およびリンパ球への結合率が著しく向上した。この結果、本発明の上記式(1)で示される白血球結合性化合物は、すべての白血球すなわち、

好中球、単球およびリンパ球に結合することが可能になったのである。例えば、従来の血球結合性化合物の、全白血球に対するリンパ球および単球への結合の割合はおおよそ12%から35%の範囲であるのに対し、本発明の血球結合性化合物の全白血球に対するリンパ球および単球への結合の割合はおおよそ18%から65%にまで上昇する。このことは、白血球浸潤の盛んな部位を標的化することが可能になったことを示しており、本発明の化合物が白血球浸潤を伴う疾患の診断用あるいは治療用医薬としての有用性を示すものがある。

本発明の白血球結合性化合物において、受容体FPRとの結合部位Z-Y-Leu-Phe-、特にリンパ球および単球の受容体との結合部位RのSerまたはThrおよび放射性金属や常磁性金属の標識部位Uのそれぞれの間の距離を、スペーサーであるX、-Lys(NH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-のεアミノ基およびスペーサーであるTを介してそれぞれ結合することにより、適切に取ることができる。このことにより、空間的構造が大きな影響を及ぼす受容体との結合性を保ちつつ、それぞれを結合することができる。すなわちZ-Y-Leu-Phe-のC末端に、RのSerまたはThrのC末端とを結合させるためには、Z-Y-Leu-Phe-のC末端部分構造に、側鎖に炭素数4からなるアルキル基にアミノ基が結合しているLysを付加して、そのεアミノ基にSerまたはThrを結合するのが好ましい。さらにより空間的距離を必要とする場合は、スペーサーXを付加するとよい。

XおよびTは、それぞれ、1もしくはそれ以上のアミノ酸および／または有機合成可能な化合物よりなるスペーサーで、必要に応じて本発明の白血球結合性化合物の分子の構成成分とすることができ、XとYは同じものでも異なってもよい。しかし、Cys残基は、スルファニル基が分子内または分子間でジスルフィド結合を形成するために二量体などの多量体を形成しやすく、その構造変化から受容体への結合性に大きく影響するため、XまたはTを構成するアミノ酸としては不適である。さらに、XまたはTがProを含む場合は、立体構造が限定されるため、空間自由度が少なく受容体への結合性に好ましくない。したがって、XまたはTを構成する配列構造に含まれるアミノ酸からは、CysおよびProは除外するのが望ましい。



具体的には、Xに用いるアミノ酸としては、受容体への結合性に影響を与えにくいGly、Ala、Val、Leu、Ileなどの非荷電性アミノ酸やNle、Tyr、Nle-Tyr等が例示される。Tとしては、受容体との結合部分から放射性金属や常磁性金属を標識した構造との距離をとる場合や、生体内における体内動態を制御する場合や、生体内における代謝への抵抗性を持たせる等の目的で、上記と同様のアミノ酸や、非アミノ酸化合物、あるいはその組み合わせを使用することができる。また、上記以外のL体およびD体アミノ酸、Glyなどの疎水性アミノ酸、Arg、Asp、Glu、Lysなどの極性アミノ酸および荷電性アミノ酸（酸性、塩基性）のいずれも適用が可能である。

10    スペーサーを構成する有機合成可能な化合物としては、メチル基、エチル基、ベンジル基などの疎水性官能基を含む、1，5—ヘキサジエン、トランス—2—メチルー1，3—ペンタジエン、4—メチル3—ニトロアセトフェノンなどの化合物；水酸基、アミド基などの極性官能基を含む、（±）—2—メチルー2，4—ペンタンジオール（ヘキシレングリコール）、3—メチルー1，3，5—ペンタントリオールなどの化合物；カルボキシル基、アミノ基、イミノ基などの荷電性官能基を含む、メチレンスクシン酸、4—マレイミド酪酸、6—マレイミドカプロン酸などの化合物などが挙げられる。

金属標識の可能な基であるUとしては、1個もしくはそれ以上のアミノ酸からなる基または非アミノ酸からなる金属標識可能な基を用いることができる。1個もしくはそれ以上のアミノ酸からなる基としては、—Cys—A1—A2で表されるペプチド（ただし、A1およびA2はCysおよびProを除くアミノ酸）が用いられる。例えば、—Cys—Gly—Asp、—Cys—Asp—Asp、—Cys—Asp—Gly、—Cys—Gly—Glu、—Cys—Glu—Glu、—Cys—Glu—Gly、—Cys—Gly—Asn、—Cys—Asn—Asn、—Cys—Asn—Gly、—Cys—Gly—Gln、—Cys—Gln—Gln、—Cys—Gln—Gly、—Cys—Gly—Lys、—Cys—Lys—Lys、—Cys—Lys—Gly、—Cys—Gly—Arg、—Cys—Arg—Arg、—Cys—Arg—Gly等が例示できる。

非アミノ酸からなる金属標識可能な基としては、1，4，7，10—テトラア

ザシクロドデカン (Cyclen)、1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン (Cyclam)、1, 4, 8, 12-テトラアザシクロペンタデカン、1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン-5, 7-ジオン (Dioxocyclam) などの炭素数8から20の窒素含有環状化合物；1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン-1, 4, 8, 11-テトラ酢酸 (TEETA)、1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-N, N', N'', N'''-テトラ酢酸 (DOTA)、1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン-5, 7-ジオン-N, N', N'', N'''-テトラ酢酸、1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-酪酸、1, 4, 8, 10-テトラアザシクロドデカン-酪酸などの炭素数8から20の窒素含有環状カルボン酸化合物；1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1-アミノエチルカルバモイルメチル-4, 7, 10-トリス [R, S]-メチル酢酸 (DO3MA)、1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1, 4, 7, 10- $\alpha$ ,  $\alpha'$ ,  $\alpha''$ ,  $\alpha'''$ -テトラメチル酢酸 (DOTMA) などの炭素数8から20の窒素含有環状カルボン酸化合物の誘導体；エチレンジアミンテトラ酢酸 (EDTA)、ジエチレントリアミンペンタ酢酸 (DTPA)、トリエチレンテトラミンヘキサ酢酸、エチレングリコール- (2-アミノエチル)-N, N, N', N''-テトラ酢酸 (EGTA) などの炭素数4から10のアルキレンアミンカルボン酸等の化合物から構成される基などが挙げられる。

本発明の白血球結合性化合物を画像診断用の医薬組成物として用いる際、目的とする診断または治療部位に応じて、体内動態を制御して不要代謝物の排泄を速やかに行い、生体への無用な被曝の軽減、画像診断を行う場合のバックグラウンドの影響を少なくして、診断部位のイメージングを速やかに行うことができる。例えば、スパーサーX、Tの構成に用いるアミノ酸等について、消化管への代謝に移行させるためにはGly、Ala、Ile、Leu、Val等の脂肪族アミノ酸、Phe、Trp、Tyr等の芳香族アミノ酸、Met等の含硫アミノ酸、もしくはメチル基、エチル基、ベンジル基などの疎水性官能基を含む化合物の利用が可能である。尿および腎臓への代謝に移行させるためにはSer、Thr等のヒドロキシアミノ酸、Asn、Gln等の酸性アミノ酸アミド、Arg、Asp、Glu、Lys等の荷電性アミノ酸（酸性、塩基性）を選択したり、合成可能な

化合物として、水酸基、アミド基などの極性官能基を含む化合物、カルボキシル基、アミノ基、イミノ基などの荷電性官能基を含む化合物を選択したりすることにより、荷電性アミノ酸もしくは荷電性官能基を有する化合物の利用が可能である。

その他、受容体との結合部分と金属標識された構造との距離をとる必要がある場合、1個以上のアミノ酸、またはアルキルなどの直鎖の有機合成可能な化合物が利用できる。

金属標識可能な基Uに含まれるアミノ酸についても、上記と同様なことが言える。例えば、AspまたはLysを選択した場合、もしくはカルボキシル基またはアミノ基を含む化合物を選択した場合には、最終的に得られる放射性金属標識物の投与後の代謝物の主要な排泄経路を腎臓に制御することができる。また、アミノ酸としてGlyなどの疎水性アミノ酸を選択した場合には、代謝物の主要な排泄経路を消化管に制御することができる。

さらにスペーサーX、Tの構成に用いるアミノ酸等について、生体内における代謝への抵抗性を持たせるためには、D体アミノ酸ならびに人工アミノ酸および非アミノ酸の利用が考えられる。D体アミノ酸から構成されるスペーサーとしては、具体的には、D-Arg-Asp、Arg-D-Asp、D-Arg-D-Asp、D-Asp-Arg、Asp-D-Arg、D-Asp-D-Arg、Ser-D-Arg、D-Ser-Arg、D-Ser-D-Arg、D-Arg-Ser、Arg-D-Ser、D-Arg-D-Ser、Ser-D-Asp、D-Ser-Asp、D-Ser-D-Asp、D-Asp-Ser、Asp-D-Ser、D-Asp-D-Ser等のアミノ酸配列を挙げることができる。

本発明の白血球結合性化合物は、以下に説明する方法により合成することができる。

(1) 全てアミノ酸から構成される場合は、アプライドバイオシステムズ社製ペプチド自動合成機等の汎用的に使用されているペプチド自動合成装置によりBoc法、あるいはFmoc法等により合成することができる。合成された複合体は、固相用樹脂担体に結合した状態から脱保護基と樹脂担体切り放しを同時に行い、その後、逆相系カラム等を用いた高速液体クロマトグラフ法（以下、HPLC法という）にて精製することができる。その他、ペプチド液相合成法により調製し

てもよく、また、動物等から採取してもよい。

- (2) 非アミノ酸化合物を含んでいる場合は、その多くの場合、上記した同様の方法によって合成できる。例えば、固相用樹脂担体に L y s 残基またはその保護誘導体を結合させ、その N 末端に X のアミノ酸残基またはその保護誘導体、あるいはスパーサーとしての機能を有する化合物またはその保護誘導体、P h e またはその保護誘導体、L e u またはその保護誘導体、Y のアミノ酸またはその保護誘導体を順次結合させ、続いて固相用樹脂担体に結合した L y s の側鎖である  $\epsilon$  アミノ基を活性化させて、R の S e r あるいは T h r またはその保護誘導体を結合させ、それにスパーサー T のアミノ酸またはその保護誘導体、あるいはスパーサーとしての機能を有する化合物またはその保護誘導体、次いで、U の金属標識可能な基となりうる化合物またはその保護誘導体を結合させ、その後樹脂担体から合成された上記式 (1) の合成物を切り放すことによって合成できる。

- 本発明の白血球結合性化合物に放射性金属または常磁性金属を標識することにより得られる標識化合物を有効成分とする医薬組成物は、放射性診断剤あるいは放射性治療剤等に用いられ、特に個体の免疫応答反応を伴う白血球浸潤の盛んな部位の画像診断、治療に好適に用いられる。すなわち、好中球または単球またはリンパ球あるいは 2 種類以上の白血球系細胞の浸潤が盛んな活動性部位を有する疾患に対して、その白血球集積部位の検出および集積程度を所定の検出器を用いて検出することができる。

- 20 個体の免疫応答反応を伴う疾患としては、哺乳動物体内の感染症、炎症、およびアテローム性動脈硬化症からなる疾患群が挙げられる。すなわち疾患群には、ウイルス感染症、細菌感染症、真菌感染症、原虫感染症、蠕虫感染症、膠原病、膠原病以外の自己免疫疾患が含まれる。また、日本人の肝炎の 8 割はウイルス感染によるウイルス性肝炎であり、その他の多くは自己免疫性肝炎であるため、肝臓における炎症性疾患の多くは好中球の浸潤量に対してリンパ球・単球浸潤が多い疾患である。このような好中球の浸潤が相対的に少ない疾患などの場合において、従来の f M L F のアナログ体では、リンパ球・単球への結合性が好中球への結合性と比較して弱いために、病変の白血球浸潤を過小評価してしまう可能性が指摘されるが、本発明による白血球結合性化合物は、好中球への結合性のみならずリンパ球や

単球への結合性が高いために、多くの自己免疫疾患やリーシュマニア症などの好中球浸潤が殆んど観察されない疾患に対しても白血球浸潤を的確に把握することが可能である。

- こうした好中球の浸潤量に対してリンパ球・単球浸潤が多い疾患群、もしくは
- 5 リンパ球・単球浸潤が白血球浸潤の多数を占める疾患群は、ウイルス感染症、原虫感染症、蠕虫感染症、膠原病、膠原病以外の自己免疫疾患が含まれる。本発明は白血球浸潤などの免疫応答を伴う疾患群に対して有効と考えられるが、好中球の浸潤量に対してリンパ球・単球浸潤が多い疾患群、もしくはリンパ球・単球浸潤が白血球浸潤の多数を占める疾患群に対して、特に有効であると考えられる。
- 10 さらに本発明は、従来技術で示された、好中球に対する結合性を併せ持つことから、リンパ球・単球の浸潤量に対して好中球浸潤が多い疾患群、もしくは好中球浸潤が白血球浸潤の多数を占める疾患群に対してもまた有効である。こうした疾患群としては、細菌性心内膜炎、心筋梗塞、気管支肺炎、大葉性肺炎、浸出性結核、急性胃炎、偽膜性大腸炎、エルシニア感染症、潰瘍性大腸炎、急性虫垂炎、急性胆管炎、胆
- 15 嚢炎、管内増殖性糸球体腎炎、浸出性糸球体腎炎、急性腎盂腎炎、急性卵管炎、急性頸管炎、急性乳腺炎、急性睾丸炎、急性前立腺炎、アレルギー性血管炎、急性化膿性炎、結核性髄膜炎、化膿性髄膜炎、急性化膿性骨髓炎、急性リンパ節炎、結節性動脈周囲炎等が挙げられる。

- 放射性診断剤として用いる場合には、本発明の白血球結合性化合物をTc-99m、In-111、Ga-67、Sn-117m、Sm-153、Re-186
- 20 などのSPECT用放射性金属または、Cu-64またはGa-68などのPET用放射性金属で標識した放射性金属標識化合物が好ましい態様である。放射性治療剤として用いる場合には、該白血球結合性化合物にY-90、Re-186またはRe-188などの放射性金属で標識した放射性金属標識化合物が好まし
- 25 い態様である。MRI造影剤として用いる場合には、該白血球結合性化合物にCu、FeまたはGdなどの常磁性金属を配位させた常磁性金属標識化合物が好ましい態様である。

Tc-99m、Re-186およびRe-188で標識する場合は、本発明の白血球結合性化合物を生理食塩液および水性緩衝液等に溶解し、塩化第一スズ等

の還元剤を加え、過テクネチウム酸ナトリウム溶液、または過レニウム酸ナトリウム溶液と混合する常套の方法により標識化合物を調製することができる。Cu、Cu-64、Fe、Mn、Gd、In-111で標識された標識化合物の場合は、本発明の白血球結合性化合物とCu、Cu-64、Fe、Mn、Gd、In-111イオンを含む弱酸性水溶性溶液とを混合することで調製できる。Ga-67、Ga-68またはY-90で標識された標識化合物は、該白血球結合性化合物とGa-67、Ga-68またはY-90イオンを含む弱酸性ないし弱アルカリ性の水溶性溶液とを混合することで調製が可能である。

放射性金属標識化合物を放射性診断剤または放射性治療剤として供する場合、および常磁性金属標識化合物をMRI造影剤として供する場合は、上述した方法によって調製される標識化合物を更にHPLC法により精製し不純物および未反応の過テクネチウム酸イオン、過レニウム酸イオン、In-111イオン、Cuイオン、Cu-64イオン、Ga-67イオン、Ga-68イオン、Feイオン、Mnイオン、GdイオンおよびY-90イオンを取り除いた後に使用してもよい。

放射性金属または常磁性金属で標識された標識化合物は、薬学的に許容される添加物と混合することにより、放射性診断剤、放射性治療剤またはMRI造影剤に調製することができる。かかる添加物としては、薬学的に許容されるアスコルビン酸、p-アミノ安息香酸等の安定化剤、水性緩衝液等のpH調整剤、D-マンニトール等の賦形剤、および放射化学的純度を改良するのに役立つクエン酸、酒石酸、マロン酸、グルコン酸ナトリウム、グルコヘプトン酸ナトリウム等が挙げられる。また、これらの添加物を加えた凍結乾燥品である用時調製用キットの形態でも提供が可能であり、本発明の放射性診断剤に特に有用である。

本発明の白血球結合性化合物を放射性金属で標識した標識化合物を含有してなる放射性診断剤、放射性治療剤またはMRI造影剤は、静脈内投与等の一般的に用いられる非経口手段により投与でき、その投与量は患者の体重、年齢、適当な放射線イメージング装置、MRI測定装置および対象疾患状態等の諸条件を考慮し、イメージングおよび治療が可能と考えられる放射能および投与量が決定される。

ヒトを対象とする場合、Tc-99m標識化合物を用いた診断剤の投与量は、

Tc-99mの放射エネルギーとして37MBq～1110MBqの範囲であり、好ましくは185MBq～1110MBqである。Re-186またはRe-188標識化合物を用いた治療剤の場合は、放射エネルギーとして37MBq～18500MBqの範囲であり、好ましくは370MBq～7400MBqである。Y-90標識化合物を用いた治療剤の場合は、放射エネルギーとして37MBq～3700MBqの範囲であり、好ましくは37MBq～1110MBqの範囲である。他の放射性金属で標識した標識化合物の投与量もほぼ同様である。また、Gd、Fe、Mn、Cuなどの常磁性金属で標識した標識化合物を用いた診断剤の投与量は、処置される宿主、MR画像化装置の感度、画像実験の標的組織、投与の特定の様式および使用の意図される効果に応じて変化する。しかし、特定の患者に対する特定の投薬処方、使用される特定の試薬の活性（誘導された緩和性）、年齢、体重、一般的な健康、性別、食事、投与時間、排泄速度、薬剤の組み合わせ、および担当医の判断を包含する種々の因子に依存する。

標識化合物は1日当たり約0.1μmol/kg体重と約1000μmol/kg体重との間、好ましくは1日当たり約0.5μmol/kg体重と約300μmol/kg体重との間である投薬レベルが有用である。代表的な調製物は、約1mM～1000mMの間の標識化合物を含む。好ましくは、このような調製物は約10mM～500mMの間の標識化合物を含む。

以下本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。以下の実施例において、得られた物質の測定方法、使用した試薬等を下記に示す。

- (1) ガンマカウンター：血液内分布の測定用としてオートウェルガンマカウンター（アロカ社製）を用いて測定した。体内分布検討の測定用として、NaIシンブルチャンネルアナライザー（応用光研社製）を用いて測定した。
- (2) ガンマカメラ：GMS-550U（東芝社製）を用いて測定した。
- (3) 逆相HPLC：逆相カラムMillipore puresil 5μm C18（4.6×150mm）を用いた。
- (4) ペプチド化合物は全て、固相合成法により作製した。
- (5)  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ： $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ ジェネレーター（メジテック；日本

メジフィジックス社製)を用い、生理食塩液として溶出したものを用いた。

(6) 試薬はすべて特級試薬以上の製品を用いた。

(7) すべての実験動物は実験に先立ち1週間12時間毎の明暗サイクル条件下で飼育した。その期間、餌および水は自由に摂取させた。

## 5 実施例 1

### ペプチドの合成

下記のペプチドを、固相合成法により製造し、以下の実施例に用いた。

### 本発明の白血球結合性化合物

- ペプチド3 : ホルミル-N l e - L e u - P h e - N l e - T y r - L y s (N  
10 H<sub>2</sub>)-ε (-S e r - C y s - G l y - A s n)  
ペプチド4 : ホルミル-N l e - L e u - P h e - N l e - T y r - L y s (N  
H<sub>2</sub>)-ε (-S e r - C y s - A s p - A s p)  
ペプチド5 : ホルミル-N l e - L e u - P h e - N l e - T y r - L y s (N  
H<sub>2</sub>)-ε (-S e r - C y s - G l y - A s p)  
15 ペプチド6 : ホルミル-N l e - L e u - P h e - N l e - T y r - L y s (N  
H<sub>2</sub>)-ε (-S e r - D - A r g - A s p - C y s - A s p - A s p)  
ペプチド7 : ホルミル-N l e - L e u - P h e - N l e - T y r - L y s (N  
H<sub>2</sub>)-ε (-S e r - シクラムテトラカルボン酸体)  
ペプチド8 : ホルミル-N l e - L e u - P h e - L y s (N H<sub>2</sub>)-ε (-S e r  
20 - D - S e r - A s n - D - A r g - C y s - A s p - A s p)  
ペプチド9 : ホルミル-N l e - L e u - P h e - N l e - T y r - L y s (N  
H<sub>2</sub>)-ε (-S e r - D - A r g - D T P A)  
ペプチド13 : ホルミル-N l e - L e u - P h e - N l e - T y r - L y s  
(N H<sub>2</sub>)-ε (-S e r - シクラム酪酸)  
25 ペプチド14 : ホルミル-N l e - L e u - P h e - N l e - T y r - L y s  
(N H<sub>2</sub>)-ε (-S e r - D - A r g - A s p - シクラム酪酸)  
ペプチド15 : ホルミル-N l e - L e u - P h e - N l e - T y r - L y s  
(N H<sub>2</sub>)-ε (-S e r - D - S e r - A s n - シクラム酪酸)  
ペプチド16 : アセチル-N l e - L e u - P h e - N l e - T y r - L y s



(NH<sub>2</sub>)—ε (—Ser—D—Arg—Asp—Cys—Asp—Asp)

ペプチド17 : カルバミル—Nle—Leu—Phe—Nle—Tyr—Lys

(NH<sub>2</sub>)—ε (—Ser—D—Arg—Asp—Cys—Asp—Asp)

ペプチド18 : メチル—Nle—Leu—Phe—Nle—Tyr—Lys (N

5 H<sub>2</sub>)—ε (—Ser—D—Arg—Asp—Cys—Asp—Asp)

上記のペプチドにおいて、シクロテトラカルボン酸体は1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン-1, 4, 8, 11-テトラ酢酸、DTPAはジエチレントリアミンペンタ酢酸、シクロテトラ酸は1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン-テトラ酸を意味する。

#### 10 対照ペプチド

ペプチド1 : ホルミル—Nle—Leu—Phe—Nle—Tyr—Lys—Glu—Cys

ペプチド2 : ホルミル—Nle—Leu—Phe—Nle—Tyr—Lys (NH<sub>2</sub>)—ε (—Cys—Asn—Asp)

15 ペプチド10 : ホルミル—Met—Leu—Phe—Lys—ε (—Gly—Gly—Cys)

ペプチド11 : ホルミル—Met—Leu—Phe—Lys—ε (—Gly—Gly—Ac—S—Bzl)

20 ペプチド12 : ホルミル—Met—Leu—Phe—Lys—ε (—Gly—Asp—Ac—S—Bzl)

#### ペプチド3の合成

アプライドバイオシステムズ社製ペプチド合成機 (モデル430A) を用い、Boc法によりMBHA樹脂 (p-Methoxy-Benzhydrylamine Resin hydrochloride, 1% Divinylbenzene-polystyrene copolymer) 樹脂を用いて0.

25 5mMスケールの条件で合成を行った。この際C末端、Lys残基の側鎖はFmoc基で保護した。ペプチド鎖を伸長、N末端アミノ基をホルミル化した後、Lys残基の側鎖Fmoc基を20%ピペリジン/DMFで切断し、側鎖側にペプチド鎖を伸長した。ペプチドの切出しは、無水フッ化水素 : p-クレゾール (80 : 20) 中、-2℃から-5℃において1.0時間反応させて行った。

精製は、カラム：YMC-Pack ODS-A SH-365-5 (30×250 mm)、溶出速度：20 ml/分、溶出液A：0.1% TFA/精製水、溶出液B：0.1% TFA/アセトニトリル、AからBへの濃度勾配条件の下、液体クロマトグラフ法 (HPLC法) を用いて行った。主ピーク分画を集め凍結乾燥して目的のペプチドを得た。得られたペプチドの純度は逆相HPLCにて検定した。

なお、MBHA樹脂のかわりにプレロードレジンをを用いても同様に合成が可能であった。

さらに、6Mの塩酸内にて110℃、22時間の加水分解を行った後、得られた主ピークに対するアミノ酸組成を求め、目的のペプチド3であることを確認した後、アミノ酸組成の一致したピークを凍結乾燥し、目的のペプチド3を得た。また、分子量を求めるためのマスマスペクトル質量分析 (以下、ESI-MS) で、理論値と一致することを確認した。以下に得られたペプチド3のアミノ酸組成の分析値 (分子当たりの個数) を示す。丸かっこ内は、目的ペプチドのアミノ酸組成の理論値 (分子当たりの個数) を示す。

ペプチド3 = Asp : (1) 1.02、Ser : (1) 0.93、Gly : (1) 1.03、Tyr : (1) 1.00、Phe : (1) 1.01、Lys : (1) 1.00、NH<sub>3</sub> (2) 2.10、Cys : (1) 0.86、Leu (1) + Nle (2) 2.88

また、得られたペプチド3のESI-MSの分析値を示す。丸かっこ内は、目的ペプチドの分子量の理論値を示す。

ESI-MS : MW = 1183.9 (1184.4)

#### その他のペプチドの合成

その他のペプチドも、同様にして合成し同定した。ペプチド1、ペプチド10、ペプチド11およびペプチド12はC末端がアミド化されていないペプチドであるため、MBHA樹脂の替わりにHMP (4-Hydroxy-Methyl-Phenoxy Methyl-Copolystyrene-1%Divinyl-Benzene Resin) 樹脂を用いてペプチド3の合成で示した同様の方法にて合成した。それぞれの同定のためのアミノ酸組成分析値およびESI-MS分析値を以下に示した。ペプチド1およびペプチド10はアミ

ノ酸組成のみ記載した。

ペプチド1=G l u : (1) 1. 04、L e u (1) 0. 99、T y r : (1)  
0. 98、P h e : (1) 0. 99、L y s : (1) 1. 00、C y s : (1)  
0. 97、N l e (2) 2. 03

5 ペプチド2=A s p : (2) 2. 00、L e u (1) 0. 86、T y r : (1)  
1. 00、P h e : (1) 1. 01、L y s : (1) 1. 00、NH<sub>3</sub> (2) 1.  
94+N l e (2) 2. 84、C y s : (1) 0. 88、N l e (2) 2. 10、  
E S I - M S : M W = 1155. 0 (1155. 4)

10 ペプチド4=A s p : (2) 2. 00、S e r : (1) 0. 90、T y r :  
(1) 0. 99、P h e : (1) 1. 01、L y s : (1) 1. 00、NH<sub>3</sub>  
(1) 1. 10、L e u (1) +N l e (2) 2. 84、C y s : (1) 0. 9  
2、E S I - M S : M W = 1243. 0 (1243. 4)

15 ペプチド5=A s p : (1) 1. 00、S e r : (1) 0. 90、G l y :  
(1) 1. 01、T y r : (1) 0. 97、P h e : (1) 1. 00、L y s :  
(1) 1. 03、NH<sub>3</sub> (1) 1. 18、L e u (1) +N l e (2) 2. 86、  
C y s : (1) 0. 91、E S I - M S : M W = 1185. 1 (1185. 4)

20 ペプチド6=A s p : (3) 3. 19、S e r : (1) 0. 97、T y r :  
(1) 0. 97、P h e : (1) 0. 98、L y s : (1) 1. 00、NH<sub>3</sub>  
(1) 1. 20、L e u (1) +N l e (2) 2. 80、A r g : (1) 1. 0  
6、C y s : (1) 0. 92、E S I - M S : M W = 1514. 4 (1514.  
7)

25 ペプチド7=S e r : (1) 0. 92、T y r : (1) 1. 00、P h e :  
(1) 1. 02、L y s : (1) 1. 00、NH<sub>3</sub> (1) 1. 15、L e u (1)  
+N l e (2) 2. 89、E S I - M S : M W = 1324. 3 (1324. 6)  
ペプチド8=A s p (3) 2. 94、S e r : (2) 1. 80、L e u : (1)  
1. 01、P h e : (1) 1. 00、L y s : (1) 1. 01、NH<sub>3</sub> (2) 2.  
10、N l e (1) 0. 95、C y s (1) 1. 01、E S I - M S : M W = 1  
324. 1 (1324. 5)

ペプチド9=S e r : (1) 0. 91、T y r : (1) 1. 00、P h e :

(1) 0.99、Lys : (1) 1.00、NH<sub>3</sub> (1) 1.23、Leu (1)  
+Nle (2) 2.87、Arg (1) 1.00、ESI-MS : MW=144  
1.4 (1441.6)

ペプチド10=Gly : (2) 1.88、Met : (1) 0.98、Phe :  
5 (1) 1.00、Lys : (1) 1.02、Leu (1) 1.04

ペプチド11=Gly : (2) 1.94、Met : (1) 0.91、Phe :  
(1) 1.00、Lys : (1) 1.02、Leu (1) 1.01、ESI-M  
S : MW=842.5 (842.4)

ペプチド12=Asp : (1) 0.94、Gly : (1) 0.92、Met :  
10 (1) 0.96、Phe : (1) 1.00、Lys : (1) 1.01、Leu  
(1) 1.00、ESI-MS : MW=901.5 (902.1)

ペプチド13=Ser : (1) 0.92、Tyr : (1) 1.00、Phe :  
(1) 1.01、Lys : (1) 1.01、NH<sub>3</sub> (1) 1.11、Leu (1)  
+Nle (2) 2.88、ESI-MS : MW=1178.3 (1178.5)  
15 ペプチド14=Asp (1) 1.01、Ser : (1) 0.91、Tyr :  
(1) 1.00、Phe : (1) 1.00、Lys : (1) 1.01、NH<sub>3</sub>  
(1) 1.06、Leu (1) +Nle (2) 2.89、Arg (1) 1.00、  
ESI-MS : MW=1449.6 (1449.8)

ペプチド15=Asp (1) 1.01、Ser : (2) 1.77、Tyr :  
20 (1) 0.98、Phe : (1) 1.00、Lys : (1) 1.01、NH<sub>3</sub>  
(2) 2.09、Leu (1) +Nle (2) 2.87、ESI-MS : MW=  
1379.5 (1379.7)

ペプチド16=Asp (3) 3.02、Ser : (1) 0.93、Tyr :  
(1) 1.00、Phe : (1) 1.00、Lys : (1) 1.00、NH<sub>3</sub>  
25 (1) 1.10、Leu (1) +Nle (2) 2.86、Arg : (1) 1.0  
1、Cys : (1) 1.07、ESI-MS : MW=1528.3 (1528.  
7)

ペプチド17=Asp (3) 2.95、Ser : (1) 0.91、Tyr :  
(1) 1.00、Phe : (1) 1.00、Lys : (1) 1.00、NH<sub>3</sub>

(1) 1. 79、Leu (1) +Nle (2) 2. 58、Arg : (1) 1. 00、Cys : (1) 1. 00、ESI-MS : MW=1529. 4 (1529. 7)

ペプチド18=Asp (3) 2. 99、Ser : (1) 0. 92、Tyr :  
 5 (1) 0. 88、Phe : (1) 0. 97、Lys : (1) 0. 97、NH<sub>3</sub>  
 (1) 1. 12、Leu (1) +Nle (1) 1. 85、Arg : (1) 1. 00、Cys : (1) 1. 03、MeNle (1) 0. 95、ESI-MS : MW  
 =1500. 5 (1500. 7)

## 実施例2

10 ペプチド1、ペプチド2、ペプチド3、ペプチド4、ペプチド5、ペプチド6、  
ペプチド7、ペプチド8、ペプチド9、ペプチド10、ペプチド13、ペプチド  
14、ペプチド15、ペプチド16、ペプチド17、ペプチド18のTc-99  
m標識

### (1) 方法

15 グルコヘプトン酸40. 3  $\mu\text{mol}$  / 300  $\mu\text{L}$ と塩化第一スズ溶液130  
 $\text{nmol}$  / 50  $\mu\text{L}$ の混合液を含有するバイアル中にTc-99m-過テクネチ  
 ウム酸ナトリウム (以下<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>) 溶液1. 1~3. 0 GBqを加え、全  
 量を1. 35 mLとした。時折転倒させることにより攪拌しながら室温で30分  
 間反応させ、その一部を取り、セルロースアセテート膜電気泳動法にてTc-9  
 20 9m-グルコヘプトン酸のTc-99m標識率が95%以上であることを確認し  
 た。

次に、実施例1で得た16種のペプチドを、それぞれジメチルホルムアミド (D  
 MF) に溶解し、ついで純水または0. 9% NaClを含む10 mM 燐酸緩衝液  
 pH 7. 4 (以下PBS)、あるいは10 mM 炭酸緩衝液 pH 10. 0 (以下C  
 25 B) を用い0. 25~12. 5  $\text{nmol}$  / 200  $\mu\text{L}$ の濃度に調製した。この溶  
 液に、Tc-99mグルコヘプトン酸溶液200  $\mu\text{L}$ を各々加え、混合攪拌し、  
 100℃から120℃に加熱して10分間反応させた。標識後、その一部を取り、  
 HPLCにより各Tc-99m標識率を求めた。HPLC条件は以下の通りであ  
 る。カラム: Millipore puresil 5  $\mu\text{m}$  C18 (4. 6×

150mm)、溶出速度：1mL/min、検出波長：220nm、放射能検出器：NaIシングルチャンネルアナライザー、溶出液A：0.1%トリフルオロ酢酸（以下TFA）/精製水、溶出液B：0.1%TFA/アセトニトリル、濃度勾配：0分（20%B）→20分（50%B）。

## 5 (2) 結果

表1に16種のTc-99m標識ペプチドの標識率を示す。得られた標識化合物のHPLC分析の代表的クロマトグラムとしてを図1にペプチド4、図2にペプチド6の結果を示す。いずれのペプチドも単一の標識生成物を認めた。表1に示した標識率の結果から上記による標識条件で、80%以上の高いTc-99m  
10 標識が可能であることが示された。

表1. Tc-99m標識ペプチドの標識率

標識化合物	放射化学的純度 (%)
Tc-99m-ペプチド1	94.4%
Tc-99m-ペプチド2	92.3%
Tc-99m-ペプチド3	97.6%
Tc-99m-ペプチド4	99.6%
Tc-99m-ペプチド5	100%
Tc-99m-ペプチド6	100%
Tc-99m-ペプチド7	100%
Tc-99m-ペプチド8	98.5%
Tc-99m-ペプチド9	97.7%
Tc-99m-ペプチド10	91.7%
Tc-99m-ペプチド13	82.0%
Tc-99m-ペプチド14	81.0%
Tc-99m-ペプチド15	96.0%
Tc-99m-ペプチド16	94.5%
Tc-99m-ペプチド17	97.2%
Tc-99m-ペプチド18	98.9%

## 実施例3

### 15 ウサギ血液内分布

(1) 実施例2においてTc-99m標識したペプチド3、ペプチド4、ペプチド6、ペプチド8、ペプチド9、ペプチド12、ペプチド13、ペプチド14、

- ペプチド15、ペプチド16、ペプチド17およびペプチド18を、実施例2と同じHPLC条件の逆相HPLCにて未標識のペプチドと標識ペプチドの分離精製を行った。グラジエント設定は20%→50% (0.1% TFAアセトニトリル/0.1% TFA水) : 0→20分で行った。続いてPercol 11比重勾配
- 5 液を作製した。Percol 11 (ファルマシアバイオテク社製) 原液 (比重1.130 g/mL) 90 mLに1.5 M NaCl 10 mLを添加し、生理食塩液と等浸透圧とした。この溶液を生理食塩液で希釈し、1.096、1.077、1.063 g/mLのPercol 11溶液を調製した。調製した1.096、1.077、1.063 g/mLのPercol 11溶液を15 mL管に各々1 mL
- 10 ずつ重層した。比重マーカービーズ (赤: 1.062、青: 1.075、橙: 1.087、緑: 1.098) により目的の密度であることを確認した。試験に用いる血液は、病原菌の接触の無いSPF (Specific Pathogen Free) でかつ健康なニュージーランドホワイト (NZW) 系ウサギ雄2 kg前後の耳静脈より採血を行い、検討に供した。
- 15 また、急性炎症である感染症を伴ったウサギ血液における血液内分布を確認するため、健康なウサギの血液の代わりに、黄色ブドウ球菌にて起炎されたウサギの血液を用いて行った。黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) の約 $10^8$ 個の生菌を生理食塩液1 mLに懸濁させ、その内の $100 \mu\text{l}$ をニュージーランドホワイト (NZW) 系ウサギ雄2 kg前後の右ふくらはぎに筋肉内投与した。
- 20 その24時間後にウサギの耳静脈より血液採血を行い、検討に供した。
- さらに慢性炎症である潰瘍性大腸炎モデルウサギの血液における血液内分布を確認するため、健康なウサギの血液の代わりに、2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) にて起炎されたウサギの血液を用いて行った。アンソニーらの方法 (Anthony et al. Int. J. Exp. Path. , 76, 215-224 (1995)) に
- 25 基づいて、ウサギ潰瘍性大腸炎モデルを作製した。即ち、TNBS 360 mgを純水4 mLに溶解し、その後エタノール 3.2 mL加え、50.0 mg/mL 46% エタノール/生理食塩液とした。1日前に絶食を行ったネンブタール麻酔下のニュージーランドホワイト (NZW) ウサギ7週齢 (1.3~1.4 kg) 雄の肛門部より、チューブを約15 cm挿入し、空気を3 mL注入した。次に、

TNBS/46% エタノール/生理食塩液を0.8mL注入し、2分間マッサージおよび体位変更を行った。4～5日後にウサギの耳静脈より血液採血を行い、検討に供した。

ウサギ血液2mLを37℃湯浴中にて5分加温した。続いてHPLC精製を行ったTc-99m-ペプチド4種の試料液 3 $\mu$ L (111MBq/mL、Tc-99m-ペプチドとして $1.8 \times 10^{-11}$ mol/mL)を加えた後、30分インキュベーションを行った。その血液試料を調製したPercoll比重勾配液に静かに重層した。2000rpm (800 $\times$ g) 15分間の遠心分離を行い、分離後チューブを凍結させた後、各画分をカッターで切断し、それぞれをオートウェルガンマカウンターにて放射エネルギーを測定し、Tc-99m-ペプチド4種の血液に占める各成分の放射能分布を求めた。

## (2) 結果

ウサギの血液学的パラメーターから白血球数1000～8000cell/ $\mu$ L、文献でみられる受容体FPR数100,000～120,000/cellの数値を基に、ウサギ血液の受容体FPRの推定量は $0.17 \sim 1.6 \times 10^{-12}$ mol/mLと計算され、ウサギにおけるペプチド/受容体比は0.01～0.11であった。全血液中の放射エネルギーに対する各血液成分の放射エネルギーの百分率を示した結果を図3に示す。また、全白血球の放射エネルギーに対する顆粒球画分の放射エネルギーとリンパ球および単球画分の放射エネルギーの百分率を示した結果を表2および表3に示す。

健康なSPFウサギ血液において、Tc-99m-ペプチド3およびTc-99m-ペプチド12は、顆粒球画分ならびにリンパ球および単球画分への分布は共に全血液中の放射エネルギーの5%以下で、強い結合はみられなかった。

黄色ブドウ球菌による感染症を伴ったウサギ血液においては、Tc-99m-ペプチド4は、30分のインキュベーション後顆粒球画分に全血液中の放射エネルギーの10.78%が分布し、リンパ球および単球画分には10.22%分布した。また、全白血球の放射エネルギーに対して顆粒球画分の放射エネルギーは50.22%であり、リンパ球および単球画分の放射エネルギーは49.78%であった。Tc-99m-ペプチド6は、30分のインキュベーション後顆粒球画分に全血液中の放射エネルギーの



1 8.27%が分布し、リンパ球および単球画分には20.21%分布した。また、全白血球の放射エネルギーに対して顆粒球画分の放射エネルギーは47.65%であり、リンパ球および単球画分の放射エネルギーは52.35%であった。ペプチド8、ペプチド9、ペプチド12、ペプチド13、ペプチド14、ペプチド15、ペプチド16、  
5 ペプチド17およびペプチド18の各Tc-99m標識化合物は、全血液中の放射エネルギーの10%以上が白血球に分布し、またリンパ球および単球画分には全白血球の放射エネルギーに対して約27%から約77%の範囲で分布していた。

比較対照のTc-99m-ペプチド12は、30分のインキュベーション後顆粒球画分に全血液中の放射エネルギーの39.73%が分布し、リンパ球および単球画分  
10 には8.89%分布した。また、全白血球の放射エネルギーに対して顆粒球画分の放射エネルギーは81.58%であり、リンパ球および単球画分の放射エネルギーは18.42%であった。これらの結果から、本発明の一部であるペプチド4、ペプチド6、ペプチド8、ペプチド9、ペプチド12、ペプチド13、ペプチド14、ペプチド15、ペプチド16、ペプチド17およびペプチド18の各Tc-99m標識化  
15 合物は、黄色ブドウ球菌による感染症を伴ったウサギ血液において従来技術のペプチドTc-99m-ペプチド12よりもリンパ球および単球画分により多く分布していたことが明らかとなった。

一方、TNBSによる潰瘍性大腸炎モデルのウサギ血液においては、図3に示されたように、Tc-99m-ペプチド3は、30分のインキュベーション後  
20 顆粒球画分に全血液中の放射エネルギーの18.44%が分布し、リンパ球および単球画分には15.94%分布した。また、全白血球の放射エネルギーに対して顆粒球画分の放射エネルギーは表3に示されたように、53.72%であり、リンパ球および単球画分の放射エネルギーは46.28%であった。Tc-99m-ペプチド6は、30分のインキュベーション後顆粒球画分に全血液中の放射エネルギーの45.44%が分布し、  
25 リンパ球および単球画分には12.60%分布した。また、全白血球の放射エネルギーに対して顆粒球画分の放射エネルギーは78.27%であり、リンパ球および単球画分の放射エネルギーは21.73%であった。比較対照のTc-99m 標識ペプチド12は、30分のインキュベーション後顆粒球画分に全血液中の放射エネルギーの15.10%が分布し、リンパ球および単球画分には8.34%分布した。また、全白血球

の放射エネルギーに対して顆粒球画分の放射エネルギーは64.66%であり、リンパ球および単球画分の放射エネルギーは35.34%であった。

これらの結果から、本発明の一部であるTc-99m-ペプチド3およびTc-99m-ペプチド6は、TNBSによる潰瘍性大腸炎モデルのウサギ血液において従来技術のペプチドTc-99m-ペプチド12よりもリンパ球および単球画分により多く分布していたことが明らかとなった。

以上のことから、本発明のペプチドが、従来技術であるTc-99m-ペプチド12と比べて、顆粒球への結合よりもリンパ球および単球により強く結合することが示され、リンパ球および単球が多く浸潤する慢性炎症に本発明のペプチドが有効であることが確認された。

表2. ウサギ白血球に対するTc-99m標識ペプチドの結合率

(全白血球に対する結合率(%) n=3, 平均値±標準偏差値)

標識化合物	感染症モデル	
	顆粒球	リンパ球 および単球
Tc-99m-ペプチド3	未実施	未実施
Tc-99m-ペプチド4	50.22±10.31	49.78±10.31
Tc-99m-ペプチド6	47.65±2.47	52.35±2.47
Tc-99m-ペプチド8	51.41±6.39	48.59±6.39
Tc-99m-ペプチド9	58.51±2.90	41.49±2.90
Tc-99m-ペプチド12	81.58±3.58	18.42±3.58
Tc-99m-ペプチド13	33.45±3.69	66.55±3.69
Tc-99m-ペプチド14	58.77±5.64	41.23±5.64
Tc-99m-ペプチド15	58.94±6.47	41.06±6.47
Tc-99m-ペプチド16	23.28±0.73	76.72±0.73
Tc-99m-ペプチド17	50.98±0.44	49.02±0.44
Tc-99m-ペプチド18	72.35±4.24	27.65±4.24

表3. ウサギ白血球に対するTc-99m標識ペプチドの結合率

(全白血球に対する結合率(%) n=3, 平均値±標準偏差値)

標識化合物	大腸炎モデル	
	顆粒球	リンパ球 および単球
Tc-99m-ペプチド3	53.72±10.74	46.28±10.74
Tc-99m-ペプチド4	未実施	未実施
Tc-99m-ペプチド6	78.27±3.16	21.73±3.16
Tc-99m-ペプチド12	64.66±4.05	35.34±4.05

## 実施例4

- 5 ペプチド3、ペプチド4、ペプチド6、ペプチド12のTc-99m標識化合物のウサギ感染症モデルによるイメージング、急性期および亜急性期炎症に対する有用性

## (1) 方法

- 黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus) の約  $10^8$  個の生菌を生理食塩液
- 10 1 mLに懸濁させ、その内の  $100 \mu\text{L}$  をニュージーランドホワイト (NZW) 系ウサギ2 kg前後の右ふくらはぎに筋肉内投与し、24時間経過後、明らかに炎症が認められたモデルウサギにペントバルビタール麻酔を施し、実施例2で得られたTc-99mで標識したペプチド3、ペプチド4、ペプチド5、ペプチド6、ペプチド7、ペプチド8、ペプチド9、ペプチド12、ペプチド13、ペプチド14、ペプチド15、ペプチド16、ペプチド17、およびペプチド18の
- 15 37～74 MBqを耳静脈内投与し、投与後5分、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間及び22時間にガンマカメラにてイメージを撮像した。投与後5分から5時間までの時間点は起炎開始後約24時間から29時間であり、急性期炎症に相当する。また投与後22時間は起炎開始後約46時間であり、亜急性期炎症に相当する。
- 20 症に相当する。

## (2) 結果

得られた結果の代表図を、図4、図5、図6、図7、図8、図9、図10、図11、図12、図13、図14、及び図15に示す。イメージ上に関心領域を設

定し、全身カウントに対する各関心領域1000画素あたりのカウントの割合  
(%投与量/K p i x e l) を求めた結果を表4に示す。また、その割合から  
[炎症] / [正常筋肉] 比 ([A] / [M] 比) を求めた結果を表5に示す。

その結果、従来技術のTc-99m-ペプチド12は、投与後2時間(起炎後  
5 26時間、急性期炎症)の[A] / [M] 比は $10.34 \pm 3.34$  (以下平  
均値 $\pm$ 標準誤差の順で示す) ( $n=3$ )、投与後22時間(起炎後46時間、亜  
急性期炎症)の[A] / [M] 比は $33.94 \pm 20.76$  ( $n=3$ ) を示し  
たが、炎症部位への集積は投与後2時間(起炎後26時間)の $1.66 \pm 0.$   
63%投与量/K p i x e l から、投与後22時間(起炎後46時間)では0.  
10 90 $\pm 0.29$ %投与量/K p i x e l と減少した。

これに対し、本発明であるTc-99m-ペプチド3は、投与後2時間(起炎  
後26時間)の[A] / [M] 比は $6.55 \pm 2.06$  ( $n=5$ )、投与後22  
時間(起炎後46時間)の[A] / [M] 比は $54.16 \pm 32.86$  ( $n=$   
5) を示し、さらに炎症への集積は投与後2時間(起炎後26時間)の0.93  
15  $\pm 0.31$ %投与量/K p i x e l から、投与後22時間(起炎後46時  
間)では $3.70 \pm 2.67$ %投与量/K p i x e l と増大した。また、T  
c-99m-ペプチド4は、投与後2時間(起炎後26時間)の[A] / [M]  
比は $6.75 \pm 2.71$  ( $n=3$ )、投与後22時間(起炎後46時間)の  
[A] / [M] 比は $29.07 \pm 19.97$  ( $n=3$ ) を示し、従来技術のT  
20 c-99m-ペプチド12よりも低い値を示したが、炎症への集積は投与後2時  
間(起炎後26時間)の $1.09 \pm 0.22$ %投与量/K p i x e l から、  
投与後22時間(起炎後46時間)では $1.85 \pm 0.34$ %投与量/K p  
i x e l と増大した。また、Tc-99m-ペプチド6は、投与後2時間(起炎  
後26時間)の[A] / [M] 比は $14.25 \pm 0.31$  ( $n=3$ )、投与後  
25 22時間(起炎後46時間)の[A] / [M] 比は $43.84 \pm 12.58$   
( $n=3$ ) を示し、炎症への集積は投与後2時間(起炎後26時間)の $1.22$   
 $\pm 0.05$ %投与量/K p i x e l から、投与後22時間(起炎後46時  
間)では $1.77 \pm 0.07$ %投与量/K p i x e l と増大した。

一般的に、感染後およそ24時間程度までは炎症巣へ浸潤する白血球の多くが

- 好中球（顆粒球の大部分を占める）から構成されるが、その後徐々に減少し、浸潤する白血球の主体はマクロファージをはじめとする単球およびリンパ球となる。臨床上、核医学検査を必要とする炎症の多くは、単球およびリンパ球の浸潤が顕著となった亜急性期以降の炎症である。この検討の結果により、本発明のペプチドが起炎後 26 時間（投与後 2 時間）の急性期のみならず、亜急性期にあたる起炎後 46 時間（投与後 22 時間）でも極めて有用であることが示された。
- 5

表 4. ウサギ感染症モデルにおける T c-9 9 m 標識ペプチドの

炎症集積 (% I D / K p i x e l )

(n=3, T c-9 9 m-ペプチド 3 のみ n=5, 平均値±標準偏差値)

標識化合物	投与後経過時間						
	5 分	1 時間	2 時間	3 時間	4 時間	5 時間	22 時間
T c-9 9 m-ペ プチド 3	0.39±0.14	0.66 ± 0.18	0.93 ± 0.31	1.08 ± 0.31	1.39 ± 0.55	1.63± 0.72	3.70 ± 2.67
T c-9 9 m-ペ プチド 4	0.95±0.24	0.91 ± 0.14	1.09 ± 0.22	1.52 ± 0.27	1.76 ± 0.39	1.84± 0.27	1.85 ± 0.34
T c-9 9 m-ペ プチド 6	0.93±0.10	0.94 ± 0.10	1.22 ± 0.05	1.49 ± 0.14	1.59 ± 0.09	1.64± 0.08	1.77 ± 0.07
T c-9 9 m-ペ プチド 8	1.59±0.38	0.97 ± 0.34	0.73 ± 0.16	0.60 ± 0.10	0.60 ± 0.14	0.62± 0.11	未実施
T c-9 9 m-ペ プチド 9	1.39±0.22	0.65 ± 0.11	0.47 ± 0.10	0.41 ± 0.10	0.42 ± 0.06	0.43± 0.03	未実施
T c-9 9 m-ペ プチド 1 2	0.86±0.14	1.31 ± 0.38	1.66 ± 0.63	1.62 ± 0.63	1.64 ± 0.66	1.59 ± 0.71	0.90 ± 0.29
T c-9 9 m-ペ プチド 1 3	1.40±0.37	1.09 ± 0.23	0.68 ± 0.12	0.52 ± 0.10	0.54 ± 0.07	0.54 ± 0.08	未実施
T c-9 9 m-ペ プチド 1 4	1.30±0.20	0.82 ± 0.18	0.58 ± 0.04	0.44 ± 0.03	0.49 ± 0.00	0.51 ± 0.02	未実施
T c-9 9 m-ペ プチド 1 5	1.36±0.30	0.83 ± 0.02	0.76 ± 0.07	0.81 ± 0.32	0.90 ± 0.33	1.04 ± 0.28	未実施
T c-9 9 m-ペ プチド 1 6	2.93±0.21	0.85 ± 0.21	0.38 ± 0.05	0.23 ± 0.05	0.16 ± 0.06	0.13 ± 0.03	未実施
T c-9 9 m-ペ プチド 1 7	2.59±0.70	1.13 ± 0.07	0.62 ± 0.03	0.47 ± 0.04	0.38 ± 0.07	0.36 ± 0.12	未実施
T c-9 9 m-ペ プチド 1 8	2.14±0.16	0.75 ± 0.26	0.34 ± 0.09	0.19 ± 0.11	0.14 ± 0.06	0.13 ± 0.04	未実施

表5. ウサギ感染症モデルにおけるTc-99m標識ペプチドの炎症／筋肉比  
(n=3, Tc-99m-ペプチド3のみn=5, 平均値±標準偏差値)

標識化合物	投与後経過時間						
	5分	1時間	2時間	3時間	4時間	5時間	22時間
Tc-99m-ペプチド3	1.64±0.57	3.56 ± 1.03	6.55 ± 2.06	8.68 ± 2.89	11.48± 2.88	13.11± 3.37	54.16± 32.86
Tc-99m-ペプチド4	1.94±0.49	4.08 ± 1.34	6.75 ± 2.71	10.65± 5.53	13.02± 5.76	14.81± 6.77	29.07± 19.97
Tc-99m-ペプチド6	2.08±0.46	6.16 ± 0.59	14.25± 0.31	24.31± 4.55	30.20± 7.49	29.67± 7.66	43.84± 12.58
Tc-99m-ペプチド8	1.31±0.56	4.27 ± 2.15	9.22 ± 3.81	13.33± 5.30	18.51± 1.88	19.30± 2.18	未実施
Tc-99m-ペプチド9	1.83±0.38	3.91 ± 0.52	5.30 ± 2.08	5.79 ± 1.48	8.87 ± 3.02	8.84± 3.03	未実施
Tc-99m-ペプチド12	2.96±0.63	7.06 ± 1.43	10.34± 3.34	13.81± 2.94	16.88± 2.80	19.64± 1.24	33.94± 20.76
Tc-99m-ペプチド13	1.60±0.22	2.84 ± 0.46	6.21 ± 1.25	5.60 ± 2.00	9.25 ± 1.63	11.26± 2.77	未実施
Tc-99m-ペプチド14	1.63±0.21	3.88 ± 0.88	12.23± 3.30	11.20± 3.73	18.93± 3.08	27.79± 9.32	未実施
Tc-99m-ペプチド15	2.41±0.09	5.94 ± 1.82	8.84 ± 4.41	11.86± 6.02	12.88± 9.40	13.32± 8.76	未実施
Tc-99m-ペプチド16	2.10±0.31	2.67 ± 0.49	4.02 ± 1.27	5.52 ± 0.13	4.14 ± 0.83	4.56 ± 0.53	未実施
Tc-99m-ペプチド17	2.02±0.36	3.16 ± 0.97	4.63 ± 1.90	7.29 ± 4.74	7.80 ± 6.33	10.71± 10.32	未実施
Tc-99m-ペプチド18	1.58±0.01	2.21 ± 0.98	3.76 ± 0.11	3.60 ± 2.71	4.18 ± 3.09	4.20 ± 2.67	未実施

## 5 実施例5

ペプチド3、ペプチド4、ペプチド6、ペプチド12のTc-99m標識化合物の体内動態

### (1) 方法

実施例2で得たTc-99m-ペプチド3、Tc-99m-ペプチド4、Tc-99m-ペプチド6及びTc-99m-ペプチド12の4種のTc-99m標識化合物のラット体内分布実験を行った。体内分布実験は、当業者の行う通常の方法で行った。即ち、試料の3.0～3.7MBqを非絶食下のSD (Sprague-Dawley) ラット (体重140～200g) にラボナール麻酔下尾静

脈より投与し、投与後5分、30分、60分及び180分にラットを腹部大動脈より放血屠殺し、各臓器を摘出しそれぞれの臓器の放射能カウントをNaIシン  
グルチャンネルアナライザーにて測定した。また、重量を測定し、これらにより  
体内分布を算出した。各臓器の放射能の割合を、臓器あたりの値(%ID/臓  
5 器)、またはグラムあたりの値(%ID/g臓器)で表した。

## (2) 結果

表6、表7、表8及び表9にその結果を示す。また、表6、表7、表8及び表  
9の結果から尿および小腸の経時変化をそれぞれ図16および図17に示す。

表6、表7、表8、表9、図16および図17より、Tc-99m標識ペプチ  
10 ドの正常ラット体内分布は、ZおよびWのアミノ酸残基の違いで大きく体内動態  
が異なることが認められた。即ち、従来技術のTc-99m-ペプチド12の代  
謝経路は、投与後5分における肝臓への高い集積、各時間点における胃への他ペ  
プチドに対する高い集積、小腸への各時間点における高い集積、小腸から続く盲  
腸への180分点での高い集積がみられることから、肝胆道系排泄経路が主流で  
15 あった(図17)。また小腸への集積が高いことは、炎症性腸疾患などの腹部炎  
症を描出することは困難である。

これに対し、本発明のペプチドのうち、請求項1記載の式におけるTおよびU  
を荷電性アミノ酸および酸性アミノ酸アミドなどの親水性アミノ酸に変更あるい  
は付加したペプチド3、ペプチド4およびペプチド6のTc-99m標識化合物  
20 は、Tc-99m-ペプチド12でみられる動態とは異なり、尿への排泄が促進  
された(図16)。特にTc-99m-ペプチド6でその傾向が顕著であった。  
この特徴は、炎症性腸疾患などの腹部炎症を描出することにおいて極めて重要で  
あり、本発明によるペプチドは、従来技術であるペプチド12に比べて、腹部、  
特に小腸への分布が低く、腹部の白血球浸潤が起こっている部位などをみる上で、  
25 より有効となることが示唆された。



表6. Tc-99m-ペプチド3の正常ラットにおける体内動態.

上段: %投与量/臓器, 下段: %投与量/g, (n=3, 平均値±標準偏差)

臓器	5 min	30 min	60 min	180 min
血液	5.345±0.824 (0.719±0.067)	1.759±0.769 (0.212±0.073)	0.657±0.150 (0.082±0.008)	0.318±0.225 (0.038±0.025)
心臓	0.182±0.014 (0.315±0.014)	0.054±0.012 (0.094±0.024)	0.020±0.003 (0.034±0.002)	0.004±0.000 (0.007±0.000)
肺	0.805±0.150 (0.868±0.116)	0.395±0.186 (0.383±0.155)	0.117±0.011 (0.128±0.010)	0.040±0.005 (0.045±0.007)
肝臓	21.912±0.529 (3.287±0.215)	16.435±3.821 (2.475±0.543)	7.339±0.595 (1.105±0.089)	1.239±0.132 (0.206±0.026)
脾臓	0.169±0.012 (0.471±0.022)	0.102±0.003 (0.239±0.020)	0.065±0.013 (0.155±0.026)	0.042±0.004 (0.102±0.014)
腎臓	15.350±1.803 (11.297±1.970)	19.142±1.543 (13.953±2.124)	14.223±1.091 (10.679±0.785)	6.016±1.089 (4.508±1.013)
胃	0.500±0.060 (0.131±0.031)	0.354±0.196 (0.090±0.037)	0.160±0.177 (0.044±0.043)	0.058±0.049 (0.018±0.012)
小腸	21.307±1.479 (2.691±0.329)	33.762±5.276 (4.504±0.939)	37.742±2.889 (5.165±0.506)	40.273±1.263 (5.787±0.208)
盲腸	0.431±0.048 (0.086±0.010)	0.125±0.035 (0.024±0.008)	0.057±0.013 (0.013±0.004)	1.636±0.993 (0.308±0.171)
結腸	0.131±0.052 (0.335±0.030)	0.050±0.024 (0.117±0.016)	0.017±0.006 (0.040±0.001)	0.022±0.026 (0.049±0.060)
直腸	0.486±0.059 (0.465±0.042)	0.164±0.010 (0.176±0.053)	0.063±0.005 (0.062±0.004)	0.050±0.020 (0.051±0.018)
副腎	0.024±0.005 (0.605±0.131)	0.008±0.001 (0.194±0.024)	0.004±0.002 (0.095±0.043)	0.001±0.000 (0.001±0.000)
卵巣	0.059±0.003 (0.735±0.034)	0.020±0.003 (0.255±0.034)	0.008±0.002 (0.106±0.019)	0.001±0.002 (0.013±0.022)
下肢骨	0.408±0.042 (0.332±0.035)	0.165±0.035 (0.139±0.030)	0.073±0.008 (0.060±0.009)	0.035±0.006 (0.029±0.006)
皮膚	1.033±0.405 (0.371±0.019)	0.362±0.067 (0.154±0.046)	0.114±0.037 (0.052±0.004)	0.026±0.010 (0.011±0.001)
筋肉	1.115±0.236 (0.146±0.018)	0.366±0.115 (0.047±0.013)	0.110±0.021 (0.016±0.002)	0.026±0.006 (0.004±0.001)
尿	0.230±0.126	15.575±3.638	34.936±2.443	48.414±2.048
糞	0.025±0.013	0.014±0.009	0.012±0.013	0.618±1.032
残全身	30.489±1.877 (0.265±0.011)	11.147±2.812 (0.099±0.027)	4.283±0.300 (0.037±0.002)	1.183±0.362 (0.010±0.003)

表 7. T c - 9 9 m - ペプチド 4 の正常ラットにおける体内動態.

上段 : %投与量/臓器, 下段 : %投与量/g, (n = 3, 平均値±標準偏差)

臓器	5 min	30 min	60 min	180 min
血液	6.189±1.270 (0.846±0.167)	1.922±0.560 (0.252±0.022)	0.823±0.350 (0.109±0.031)	0.126±0.021 (0.017±0.003)
心臓	0.163±0.036 (0.306±0.077)	0.043±0.006 (0.086±0.010)	0.026±0.013 (0.039±0.010)	0.004±0.001 (0.007±0.001)
肺	0.652±0.096 (0.726±0.107)	0.243±0.027 (0.279±0.057)	0.147±0.016 (0.160±0.021)	0.068±0.017 (0.075±0.023)
肝臓	18.159±2.621 (2.810±0.295)	11.820±1.257 (1.889±0.186)	6.583±0.266 (1.032±0.061)	1.358±0.284 (0.232±0.065)
脾臓	0.144±0.010 (0.367±0.064)	0.110±0.014 (0.275±0.032)	0.076±0.015 (0.192±0.031)	0.059±0.009 (0.160±0.027)
腎臓	5.643±2.131 (4.354±1.312)	4.671±0.594 (3.806±0.604)	3.938±0.323 (3.365±0.433)	3.433±1.054 (2.814±0.926)
胃	4.484±4.613 (0.905±0.747)	0.340±0.145 (0.115±0.042)	0.391±0.293 (0.118±0.085)	0.178±0.092 (0.050±0.025)
小腸	28.887±3.569 (3.862±0.976)	41.173±0.337 (5.648±0.657)	44.035±4.359 (5.876±0.659)	13.553±1.591 (1.997±0.239)
盲腸	0.358±0.029 (0.089±0.019)	0.116±0.011 (0.029±0.003)	0.077±0.032 (0.018±0.004)	36.011±2.291 (6.306±0.610)
結腸	0.244±0.120 (0.395±0.046)	0.072±0.024 (0.172±0.089)	0.032±0.016 (0.071±0.031)	0.115±0.014 (0.289±0.115)
直腸	0.476±0.241 (0.565±0.124)	0.125±0.004 (0.166±0.019)	0.083±0.037 (0.100±0.057)	0.060±0.022 (0.061±0.013)
副腎	0.024±0.003 (0.604±0.253)	0.010±0.001 (0.242±0.067)	0.004±0.001 (0.092±0.009)	0.001±0.001 (0.037±0.014)
卵巣	0.069±0.026 (0.861±0.327)	0.016±0.005 (0.204±0.062)	0.008±0.001 (0.101±0.011)	0.003±0.001 (0.035±0.017)
下肢骨	0.342±0.017 (0.304±0.019)	0.167±0.020 (0.150±0.022)	0.0160±0.026 (0.095±0.002)	0.044±0.015 (0.039±0.012)
皮膚	0.506±0.217 (0.321±0.039)	0.414±0.189 (0.168±0.016)	0.099±0.017 (0.062±0.018)	0.022±0.006 (0.015±0.001)
筋肉	0.850±0.112 (0.132±0.014)	0.296±0.060 (0.054±0.016)	0.115±0.037 (0.019±0.006)	0.023±0.003 (0.004±0.000)
尿	5.258±2.993	26.706±0.900	37.798±2.759	42.009±0.925
糞	0.027±0.002	0.095±0.101	0.097±0.079	1.485±2.389
残全身	27.525±2.159 (0.260±0.042)	11.661±0.196 (0.111±0.008)	5.563±1.766 (0.052±0.017)	1.448±0.256 (0.014±0.002)

表 8. Tc-99m-ペプチド6の正常ラットにおける体内動態.

上段: %投与量/臓器, 下段: %投与量/g, (n=3, 平均値±標準偏差)

臓器	5 min	30 min	60 min	180 min
血液	11.205±0.809 (1.414±0.176)	3.657±1.074 (0.451±0.052)	0.936±0.364 (0.123±0.020)	0.532±0.421 (0.062±0.044)
心臓	0.275±0.050 (0.494±0.083)	0.097±0.026 (0.161±0.029)	0.029±0.008 (0.056±0.017)	0.014±0.006 (0.024±0.009)
肺	1.770±0.274 (1.770±0.263)	0.715±0.037 (0.752±0.062)	0.369±0.029 (0.390±0.054)	0.159±0.023 (0.167±0.017)
肝臓	6.374±0.900 (1.003±0.162)	4.097±0.758 (0.607±0.113)	2.713±0.379 (0.465±0.072)	2.167±0.369 (0.353±0.042)
脾臓	0.229±0.050 (0.548±0.092)	0.140±0.040 (0.198±0.083)	0.105±0.028 (0.284±0.054)	0.090±0.014 (0.210±0.011)
腎臓	10.176±2.359 (7.546±1.996)	5.916±2.411 (3.971±1.559)	3.867±1.501 (2.975±1.020)	2.634±1.172 (1.838±0.732)
胃	0.658±0.196 (0.297±0.022)	0.443±0.204 (0.166±0.090)	0.166±0.037 (0.049±0.003)	0.104±0.067 (0.028±0.011)
小腸	3.680±0.549 (0.592±0.073)	3.385±0.898 (0.472±0.117)	3.858±0.753 (0.596±0.120)	0.996±0.574 (0.163±0.099)
盲腸	0.662±0.009 (0.165±0.020)	0.237±0.039 (0.049±0.007)	0.097±0.009 (0.022±0.008)	2.202±0.468 (0.396±0.115)
結腸	0.311±0.110 (0.625±0.094)	0.140±0.087 (0.223±0.057)	0.047±0.009 (0.094±0.010)	0.031±0.021 (0.069±0.037)
直腸	0.895±0.245 (0.913±0.169)	0.424±0.151 (0.503±0.372)	0.260±0.130 (0.329±0.245)	0.051±0.010 (0.052±0.009)
副腎	0.027±0.003 (0.668±0.077)	0.011±0.001 (0.276±0.033)	0.005±0.001 (0.117±0.029)	0.002±0.001 (0.061±0.035)
卵巣	0.096±0.004 (1.195±0.048)	0.044±0.003 (0.546±0.040)	0.020±0.003 (0.251±0.044)	0.013±0.009 (0.160±0.117)
下肢骨	0.578±0.044 (0.489±0.065)	0.264±0.014 (0.221±0.014)	0.122±0.030 (0.101±0.023)	0.067±0.008 (0.053±0.005)
皮膚	1.756±0.161 (0.652±0.069)	0.640±0.214 (0.273±0.008)	0.238±0.051 (0.088±0.011)	0.044±0.014 (0.024±0.006)
筋肉	1.632±0.201 (0.236±0.021)	0.688±0.279 (0.094±0.026)	0.180±0.036 (0.027±0.004)	0.066±0.009 (0.009±0.000)
尿	7.770±2.348	56.342±5.430	78.567±2.774	87.408±1.020
糞	0.048±0.016	0.056±0.033	0.025±0.011	0.646±0.636
残全身	51.858±1.751 (0.465±0.026)	22.704±3.734 (0.199±0.024)	8.397±1.185 (0.079±0.014)	2.772±0.661 (0.025±0.007)

表 9. T c - 9 9 m - ペプチド 1 2 の正常ラットにおける体内動態.

上段 : %投与量/臓器, 下段 : %投与量/g, (n = 3, 平均値±標準偏差)

臓器	5 min	30 min	60 min	180 min
血液	4.615±0.611 (0.683±0.074)	0.880±0.059 (0.146±0.019)	0.613±0.185 (0.112±0.038)	0.332±0.205 (0.054±0.035)
心臓	0.110±0.016 (0.205±0.030)	0.021±0.004 (0.040±0.008)	0.016±0.006 (0.031±0.009)	0.009±0.007 (0.018±0.014)
肺	0.221±0.021 (0.259±0.013)	0.065±0.008 (0.073±0.005)	0.052±0.011 (0.061±0.012)	0.030±0.019 (0.036±0.025)
肝臓	32.141±1.082 (4.547±0.226)	1.527±0.301 (0.235±0.028)	0.696±0.083 (0.107±0.019)	0.320±0.221 (0.054±0.036)
脾臓	0.055±0.005 (0.135±0.013)	0.019±0.003 (0.046±0.008)	0.014±0.002 (0.039±0.003)	0.013±0.010 (0.035±0.023)
腎臓	1.380±0.161 (1.055±0.152)	1.080±0.125 (0.876±0.145)	1.043±0.167 (0.830±0.123)	1.017±0.639 (0.822±0.525)
胃	0.802±0.643 (0.219±0.167)	1.884±1.594 (0.516±0.446)	1.748±0.191 (0.586±0.076)	1.953±1.069 (0.596±0.178)
小腸	44.145±2.931 (5.915±0.448)	86.860±2.200 (12.285±0.316)	86.308±1.540 (12.392±0.927)	11.574±15.140 (1.888±2.411)
盲腸	0.161±0.22 (0.043±0.004)	0.076±0.003 (0.020±0.002)	0.169±0.047 (0.043±0.007)	73.702±24.073 (15.226±6.088)
結腸	0.080±0.006 (0.167±0.007)	0.023±0.005 (0.048±0.006)	0.026±0.009 (0.046±0.011)	0.048±0.016 (0.112±0.052)
直腸	0.162±0.038 (0.175±0.003)	0.041±0.011 (0.053±0.005)	0.037±0.010 (0.045±0.011)	0.019±0.011 (0.022±0.016)
副腎	0.009±0.001 (0.223±0.031)	0.002±0.000 (0.057±0.009)	0.002±0.000 (0.054±0.011)	0.001±0.001 (0.235±0.032)
卵巣	0.29±0.008 (0.368±0.100)	0.008±0.001 (0.098±0.015)	0.007±0.001 (0.088±0.014)	0.008±0.001 (0.038±0.016)
下肢骨	0.165±0.026 (0.140±0.016)	0.057±0.005 (0.050±0.005)	0.049±0.006 (0.043±0.008)	0.029±0.021 (0.025±0.017)
皮膚	0.374±0.040 (0.165±0.027)	0.091±0.016 (0.073±0.008)	0.104±0.025 (0.036±0.002)	0.042±0.047 (0.0018±0.019)
筋肉	0.374±0.040 (0.165±0.027)	0.137±0.031 (0.021±0.004)	0.105±0.027 (0.016±0.004)	0.047±0.023 (0.007±0.004)
尿	0.400±0.154	2.687±0.285	5.493±0.833	8.767±5.591
糞	0.025±0.002	0.049±0.005	0.105±0.019	0.373±0.122
残全身	14.537±1.466 (0.134±0.015)	4.493±0.616 (0.041±0.006)	3.411±0.465 (0.031±0.004)	1.720±1.276 (0.016±0.012)

## 実施例 6

ラット潰瘍性大腸炎モデルにおける体内動態、慢性炎症に対する有用性

## (1) 方法

- 5 炎症モデル作製：アンソニーらの方法（Anthony et al. Int. J. Exp. Path., 76, 215-224 (1995)）に基づいて、ラット潰瘍性大腸炎モデルを作製した。2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸（TNBS）360mgを純水4mLに溶解し、その後エタノール3.2mL加え、50.0mg/mL 46%エタノール/生理食塩液とした。24時間前に絶食を行ったエーテル麻酔下のSD系
- 10 ラット（Sprague Dawley, Specific Pathogen Free）雌7週齢（164～177g）の肛門部より、チューブを7～8cm挿入し、空気を0.1mL注入した。次に、TNBS/46%エタノール/生理食塩液を0.2mL注入し、2分間マッサージおよび体位変更を行った。5日後に実験に供した。

- 実施例2で得られたTc-99m-ペプチド3、Tc-99m-ペプチド4、Tc-99m-ペプチド6および比較対照として従来技術のTc-99m-ペプチド12それぞれ1匹あたり約7.4MBqを尾静脈内投与し、5分後、30分後、60分後、180分後に屠殺し各臓器の放射能分布をNaIシングルチャンネルアナライザーにて測定し、各臓器あたりの%投与量、臓器1gあたりの%投与量を求めた。起炎個所をもつ直腸を炎症部位として、臓器1gあたりの%投与量を
- 20 基に〔直腸（炎症）〕／〔筋肉〕比（〔A〕／〔M〕比）および〔直腸（炎症）〕／〔血液〕比（〔A〕／〔B〕比）を求めた。

## (2) 結果

結果を、表10、表11、表12および表13に示す。

- Tc-99m-ペプチド3は、投与後5分では〔A〕／〔M〕比3.36±0.58、投与後180分では7.91±1.16を示し、非炎症部位である筋肉に対して炎症部位は高い放射能を示すとともに〔A〕／〔M〕比の経時的増加傾向を示した。また投与後60分以降、〔A〕／〔B〕比は1を超え、投与後180分では2.00±1.50を示し、増加傾向がみられた。これは血流増加を反映した非特異的集積ではなく、炎症への特異的集積によるものと考えられ
- 25

る。

Tc-99m-ペプチド4は、投与後5分では[A] / [M] 比  $4.37 \pm 0.68$ 、投与後180分では  $9.29 \pm 2.82$  を示し、非炎症部位である筋肉に対して炎症部位は高い放射能を示すとともに[A] / [M] 比の経時的増加傾向を示した。また投与後60分以降、[A] / [B] 比は1を超え、投与後180分では  $1.51 \pm 0.41$  を示し、増加傾向がみられた。これは血流増加を反映した非特異的集積ではなく、炎症への特異的集積によるものと考えられる。

Tc-99m-ペプチド6は、投与後5分では[A] / [M] 比  $4.41 \pm 0.97$ 、投与後180分では  $16.50 \pm 11.08$  を示し、非炎症部位である筋肉に対して炎症部位は高い放射能を示すとともに[A] / [M] 比の経時的増加傾向を示した。また投与後30分以降、[A] / [B] 比は1を超え、投与後180分では  $2.74 \pm 1.72$  を示し、増加傾向がみられた。これは血流増加を反映した非特異的集積ではなく、炎症への特異的集積によるものと考えられる。

Tc-99m-ペプチド12は投与後5分では[A] / [M] 比  $4.66 \pm 3.13$ 、投与後180分では  $6.22 \pm 4.61$  を示し、本発明のペプチドと比較して低い[A] / [M] 比であった。

また[A] / [M] 比は投与後60分で最大値  $11.10 \pm 12.33$  を示したものの、その後減少した。[A] / [B] 比では、投与後60分で、  $1.89 \pm 2.39$  を示したものの、その後減少し、投与後180分では  $1.00 \pm 0.89$  であった。

本検討から、従来技術のペプチド12よりも、リンパ球および単球の浸潤が多い慢性期の炎症部位への集積性および滞留性などの点でも本発明のペプチドが優れ、潰瘍性大腸炎などの慢性炎症に対しても有用であることが示された。

表10. T c - 9 9 m - ペプチド3のモデル動物体内動態.

上段：%投与量/臓器，下段：%投与量/g，（n = 3，平均値±標準偏差）

臓器	5 分	30 分	60 分	180 分
血液	6.145±1.475 (0.912±0.084)	2.397±1.066 (0.341±0.097)	0.763±0.238 (0.108±0.025)	0.164±0.120 (0.023±0.013)
心臓	0.0167±0.004 (0.345±0.006)	0.045±0.006 (0.101±0.009)	0.020±0.001 (0.042±0.004)	0.004±0.000 (0.008±0.001)
肺	0.840±0.027 (1.031±0.058)	0.248±0.004 (0.308±0.016)	0.151±0.020 (0.177±0.029)	0.053±0.016 (0.068±0.025)
肝臓	24.382±2.015 (4.146±0.528)	16.240±2.633 (2.872±0.793)	7.993±1.993 (1.310±0.313)	1.249±0.250 (0.234±0.053)
脾臓	0.211±0.008 (0.597±0.046)	0.075±0.023 (0.212±0.070)	0.074±0.018 (0.207±0.037)	0.053±0.016 (0.136±0.043)
腎臓	13.030±1.588 (11.263±1.648)	18.869±6.719 (15.816±5.386)	16.068±1.238 (13.353±1.426)	6.248±0.746 (5.333±0.482)
胃	1.428±0.982 (0.402±0.242)	0.181±0.072 (0.058±0.034)	0.082±0.013 (0.025±0.005)	0.035±0.016 (0.013±0.006)
小腸	20.876±4.511 (3.056±0.970)	34.286±8.601 (5.520±2.262)	37.506±2.672 (5.249±0.446)	25.538±19.634 (4.165±3.176)
盲腸	0.405±0.085 (0.110±0.031)	0.192±0.134 (0.030±0.003)	0.080±0.024 (0.015±0.004)	14.113±13.789 (3.030±2.871)
結腸	0.228±0.044 (0.484±0.028)	0.052±0.033 (0.140±0.012)	0.046±0.026 (0.083±0.044)	0.087±0.110 (0.229±0.315)
直腸 (炎症)	0.590±0.118 (0.573±0.047)	0.286±0.210 (0.203±0.036)	0.110±0.062 (0.097±0.035)	0.089±0.024 (0.041±0.021)
副腎	0.026±0.003 (0.294±0.360)	0.008±0.001 (0.097±0.065)	0.003±0.001 (0.067±0.019)	0.001±0.001 (0.082±0.084)
卵巣	0.062±0.046 (0.779±0.572)	0.011±0.000 (0.135±0.003)	0.005±0.002 (0.069±0.020)	0.005±0.005 (0.069±0.057)
下肢骨	0.225±0.047 (0.211±0.047)	0.087±0.019 (0.086±0.032)	0.049±0.018 (0.050±0.023)	0.035±0.022 (0.036±0.023)
皮膚	0.378±0.114 (0.220±0.017)	0.191±0.211 (0.102±0.049)	0.103±0.018 (0.062±0.041)	0.069±0.047 (0.040±0.034)
筋肉	0.537±0.180 (0.104±0.008)	0.181±0.101 (0.032±0.015)	0.094±0.014 (0.018±0.009)	0.068±0.049 (0.014±0.012)
尿	0.681±0.234	4.094±0.769	6.071±0.796	8.305±2.667
糞	0.656±1.023	0.073±0.031	0.073±0.002	0.430±0.391
残全身	16.159±2.511 (0.197±0.056)	5.820±1.595 (0.065±0.027)	3.392±1.387 (0.040±0.024)	2.661±2.059 (0.036±0.035)
直腸(炎症)/血液	0.64±0.04	0.63±0.10	1.09±0.70	2.00±1.50
直腸(炎症)/筋肉	3.36±0.58	4.00±0.95	4.78±1.57	7.91±1.16

表11. Tc-99m-ペプチド4のモデル動物体内動態.

上段: %投与量/臓器, 下段: %投与量/g, (n=3, 平均値±標準偏差)

臓器	5 分	30 分	60 分	180 分
血液	5.232±1.667 (0.625±0.114)	1.764±0.087 (0.213±0.055)	0.821±0.308 (0.092±0.016)	0.146±0.029 (0.019±0.002)
心臓	0.132±0.032 (0.229±0.058)	0.041±0.006 (0.080±0.019)	0.017±0.004 (0.031±0.008)	0.004±0.002 (0.007±0.002)
肺	0.571±0.230 (0.640±0.236)	0.373±0.074 (0.390±0.086)	0.171±0.040 (0.182±0.035)	0.069±0.025 (0.075±0.023)
肝臓	18.757±3.225 (2.617±0.132)	13.932±3.695 (1.922±0.413)	7.344±0.694 (1.072±0.231)	1.219±0.163 (0.200±0.024)
脾臓	0.175±0.088 (0.362±0.051)	0.170±0.055 (0.416±0.168)	0.081±0.008 (0.176±0.046)	0.069±0.031 (0.171±0.053)
腎臓	4.564±0.850 (3.131±0.507)	5.646±0.919 (4.276±0.533)	5.439±1.647 (4.262±1.522)	6.237±1.026 (4.490±0.638)
胃	1.304±1.206 (0.323±0.206)	0.209±0.097 (0.057±0.032)	0.149±0.024 (0.039±0.011)	0.090±0.062 (0.035±0.019)
小腸	33.890±4.651 (4.095±0.762)	41.709±7.462 (5.413±1.168)	45.378±2.739 (6.383±0.486)	30.633±19.329 (4.459±2.611)
盲腸	0.294±0.074 (0.060±0.012)	0.094±0.023 (0.022±0.002)	0.078±0.061 (0.016±0.010)	18.242±20.821 (4.248±4.880)
結腸	0.181±0.171 (0.289±0.072)	0.048±0.015 (0.114±0.047)	0.019±0.014 (0.046±0.010)	0.053±0.066 (0.112±0.135)
直腸 (炎症)	0.410±0.157 (0.468±0.127)	0.410±0.398 (0.216±0.150)	0.133±0.092 (0.115±0.076)	0.032±0.011 (0.028±0.008)
副腎	0.015±0.005 (0.376±0.119)	0.005±0.002 (0.129±0.061)	0.004±0.000 (0.095±0.008)	0.001±0.000 (0.023±0.008)
卵巣	0.042±0.012 (0.529±0.150)	0.025±0.011 (0.309±0.133)	0.006±0.002 (0.080±0.020)	0.002±0.000 (0.022±0.003)
下肢骨	0.377±0.054 (0.289±0.033)	0.218±0.052 (0.174±0.053)	0.121±0.008 (0.097±0.009)	0.078±0.023 (0.061±0.017)
皮膚	0.773±0.276 (0.268±0.050)	0.327±0.233 (0.131±0.047)	0.112±0.048 (0.044±0.007)	0.025±0.011 (0.009±0.002)
筋肉	0.757±0.118 (0.106±0.014)	0.310±0.157 (0.047±0.026)	0.101±0.012 (0.013±0.001)	0.022±0.008 (0.03±0.001)
尿	9.976±3.195	23.885±2.560	35.648±1.482	41.509±2.049
糞	0.104±0.139	0.032±0.034	0.024±0.023	0.215±0.305
残全身	22.375±2.165 (0.192±0.029)	10.901±4.459 (0.101±0.058)	4.354±0.670 (0.037±0.005)	1.353±0.323 (0.011±0.002)
直腸(炎症) /血液	0.74±0.10	0.95±0.42	1.26±0.82	1.51±0.41
直腸(炎症) /筋肉	4.37±0.68	4.46±1.00	8.81±6.35	9.29±2.82



表12. Tc-99m-ペプチド6のモデル動物体内動態.

上段: %投与量/臓器, 下段: %投与量/g, (n=3, 平均値±標準偏差)

臓器	5 分	30 分	60 分	180 分
血液	5.232±1.667 (0.625±0.114)	1.770±0.092 (0.214±0.057)	0.818±0.304 (0.092±0.016)	0.146±0.029 (0.019±0.002)
心臓	0.132±0.032 (0.229±0.058)	0.42±0.006 (0.080±0.020)	0.017±0.004 (0.031±0.008)	0.004±0.002 (0.007±0.002)
肺	0.571±0.230 (0.640±0.236)	0.374±0.076 (0.391±0.088)	0.170±0.040 (0.181±0.035)	0.069±0.025 (0.075±0.023)
肝臓	18.757±3.225 (2.617±0.132)	13.991±3.796 (1.930±0.126)	7.322±0.720 (1.069±0.235)	1.219±0.163 (0.200±0.024)
脾臓	0.175±0.088 (0.362±0.051)	0.171±0.055 (0.418±0.170)	0.081±0.008 (0.176±0.046)	0.069±0.031 (0.171±0.053)
腎臓	4.564±0.850 (3.131±0.507)	5.664±0.917 (4.291±0.548)	5.427±1.667 (4.254±1.536)	6.237±1.026 (4.490±0.638)
胃	1.304±1.206 (0.323±0.206)	0.210±0.098 (0.057±0.033)	0.519±0.649 (0.107±0.109)	0.090±0.062 (0.035±0.019)
小腸	33.890±4.651 (4.095±0.762)	41.389±7.985 (5.371±1.225)	45.175±2.447 (6.357±0.498)	30.633±19.329 (4.459±2.611)
盲腸	0.294±0.074 (0.060±0.012)	0.198±0.166 (0.049±0.044)	0.078±0.061 (0.016±0.010)	18.242±20.821 (4.248±4.880)
結腸	0.181±0.171 (0.289±0.072)	0.048±0.014 (0.115±0.048)	0.019±0.014 (0.046±0.010)	0.053±0.066 (0.112±0.135)
直腸 (炎症)	0.410±0.157 (0.468±0.127)	0.413±0.402 (0.217±0.152)	0.132±0.091 (0.114±0.075)	0.032±0.011 (0.028±0.008)
副腎	0.015±0.005 (0.376±0.119)	0.005±0.002 (0.130±0.062)	0.004±0.000 (0.094±0.008)	0.001±0.000 (0.023±0.008)
卵巣	0.042±0.012 (0.529±0.150)	0.025±0.011 (0.311±0.136)	0.006±0.002 (0.080±0.021)	0.002±0.000 (0.022±0.003)
下肢骨	0.377±0.054 (0.289±0.033)	0.219±0.054 (0.174±0.054)	0.120±0.008 (0.097±0.010)	0.078±0.023 (0.061±0.017)
皮膚	0.773±0.276 (0.268±0.050)	0.328±0.237 (0.131±0.048)	0.112±0.048 (0.044±0.007)	0.025±0.011 (0.009±0.002)
筋肉	0.757±0.118 (0.106±0.014)	0.311±0.160 (0.047±0.026)	0.101±0.012 (0.013±0.001)	0.022±0.008 (0.03±0.001)
尿	9.976±3.195	23.955±2.467	35.537±1.650	41.509±2.049
糞	0.104±0.139	0.032±0.034	0.024±0.023	0.215±0.305
残全身	22.375±2.165 (0.192±0.029)	10.953±4.550 (0.101±0.058)	4.338±0.643 (0.037±0.005)	1.353±0.323 (0.011±0.002)
直腸(炎症) /血液	0.75±0.13	1.27±1.04	1.88±1.44	2.74±1.72
直腸(炎症) /筋肉	4.41±0.97	5.54±2.99	13.16±11.07	16.50±11.08

表13. Tc-99m-ペプチド12のモデル動物体内動態.

上段: %投与量/臓器, 下段: %投与量/g, (n=3, 平均値±標準偏差)

臓器	5 分	30 分	60 分	180 分
血液	10.140±9.197 (2.016±0.074)	1.122±0.291 (0.179±0.036)	0.954±0.447 (0.170±0.068)	0.308±0.193 (0.069±0.055)
心臓	0.111±0.045 (0.269±0.082)	0.027±0.001 (0.061±0.014)	0.020±0.011 (0.049±0.026)	0.007±0.002 (0.018±0.009)
肺	0.280±0.049 (0.382±0.067)	0.086±0.017 (0.107±0.032)	0.071±0.032 (0.096±0.049)	0.038±0.029 (0.054±0.050)
肝臓	21.311±7.503 (3.326±0.361)	2.012±0.397 (0.322±0.075)	0.972±0.399 (0.162±0.074)	0.345±0.235 (0.059±0.042)
脾臓	0.072±0.020 (0.189±0.029)	0.024±0.006 (0.064±0.019)	0.018±0.006 (0.053±0.018)	0.009±0.004 (0.031±0.024)
腎臓	1.440±0.326 (1.369±0.302)	1.077±0.192 (0.977±0.383)	1.486±1.002 (1.377±0.996)	0.598±0.056 (0.506±0.065)
胃	2.461±2.801 (0.631±0.414)	3.446±4.540 (1.050±1.309)	1.990±0.778 (0.659±0.263)	3.500±4.830 (1.245±1.129)
小腸	43.689±4.685 (6.289±0.568)	82.028±4.176 (12.654±1.252)	80.691±9.250 (13.503±2.964)	82.578±1.469 (13.121±2.433)
盲腸	0.447±0.366 (0.061±0.008)	0.116±0.019 (0.030±0.008)	0.203±0.070 (0.061±0.025)	2.703±3.959 (0.783±1.253)
結腸	0.194±0.152 (0.423±0.333)	0.021±0.001 (0.061±0.009)	0.046±0.032 (0.103±0.077)	0.026±0.024 (0.057±0.054)
直腸 (炎症)	1.149±1.318 (0.486±0.319)	0.117±0.060 (0.124±0.044)	0.637±0.947 (0.398±0.557)	0.203±0.328 (0.098±0.142)
副腎	0.018±0.002 (0.441±0.044)	0.004±0.002 (0.091±0.047)	0.017±0.024 (0.420±0.610)	0.002±0.003 (0.059±0.072)
卵巣	0.052±0.027 (0.646±0.334)	0.011±0.000 (0.137±0.004)	0.015±0.016 (0.182±0.197)	0.004±0.004 (0.052±0.050)
下肢骨	0.225±0.047 (0.211±0.047)	0.066±0.032 (0.078±0.026)	0.066±0.032 (0.062±0.027)	0.28±0.020 (0.028±0.021)
皮膚	0.378±0.114 (0.220±0.017)	0.191±0.149 (0.096±0.037)	0.130±0.048 (0.103±0.076)	0.052±0.044 (0.030±0.029)
筋肉	0.537±0.180 (0.104±0.008)	0.174±0.073 (0.030±0.011)	0.120±0.045 (0.026±0.015)	0.052±0.044 (0.011±0.010)
尿	0.681±0.234	3.690±0.886	6.171±0.589	7.135±2.769
糞	0.656±1.023	0.070±0.023	0.356±0.490	0.331±0.325
残全身	16.159±2.511 (0.197±0.056)	5.702±1.146 (0.062±0.020)	6.036±4.684 (0.070±0.056)	2.081±1.769 (0.027±0.029)
直腸(炎症) /血液	0.43±0.16	0.72±0.33	1.89±2.39	1.00±0.89
直腸(炎症) /筋肉	4.66±3.13	4.21±1.15	11.10±12.33	6.22±4.61

## 実施例 7

Tc-99m標識されたペプチド3、ペプチド6のヒト血液内分布

## (1) 方法

本発明がヒトを対象とした臨床においても有効であるかを確認するため、ヒト  
5 血液を用いた検討で、本発明のペプチド2種について白血球に対する結合性を確  
認した。実施例2にてTc-99m標識されたペプチド3、ペプチド6を、実施  
例2と同じHPLC条件の逆相HPLCにて未標識のペプチドと標識ペプチドの  
分離精製を行った。グラジエント設定は20%→80% (0.1% TFAアセト  
ニトリル/0.1% TFA水) : 0→20分で行った。(ペプチド6の精製後の  
10 放射エネルギーは111 MBq/mLであった。)

また従来技術のペプチドとして、Tc-99m-ペプチド11、Tc-99m-  
ペプチド12の調製を行った。ペプチド11とペプチド12をジメチルホルムア  
ミド (DMF) に溶解し、濃度0.1 mg/500 μLに調製した。酒石酸/P  
BS液 (5 mg/200 mL) にSnCl<sub>2</sub>/10 mM 塩酸溶液 (5 mg/1  
15 0 mL) 50 mLを添加し、ペプチド溶液を加えて直ちに<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>溶液  
(2738 MBq/mL) を0.25 mL注入した。数秒振盪後120℃ 10分  
の標識反応を行った。終濃度は~855.6 MBq/125 mg/mLであった。  
分取精製および放射化学的純度の測定をHPLCを用い行った。分析条件は、実  
施例2と同様の条件で、グラジエント設定は20%→50% (0.1% TFAア  
20 セトニトリル/0.1% TFA水) : 0→20分で行った。精製後の放射能濃度  
は287~311 MBq/mLであった。

続いて、実施例3に記載された方法に基づいてPercol 11比重勾配液を作  
製した。

40歳までの成人ボランティアより20~30 mLの血液を採取した。続いて  
25 Tc-99m標識ペプチドそれぞれを30 μL (111 MBq/mL、Tc-ペ  
プチドとして $1.8 \times 10^{-11}$  mol/mL) 加えた後、30分インキュベー  
ションを行った。その血液試料2~3 mLを抜き取り、調製したPercol 11比  
重勾配液に静かに重層した。2000 rpm (800 × g) 15分間の遠心を行  
い、チューブを凍結させた後、各画分をカッターで切断し、それぞれをオート

ウェルガンマカウンターにて放射エネルギーを測定し各血液成分中の $Tc-99m$ 標識ペプチドの放射能分布を求めた。

## (2) 結果

ヒトの血液学的パラメーターから白血球数 $4100 \sim 6100 \text{ cell/mL}$ 、  
5 文献でみられる受容体FPR数 $100,000 \sim 120,000/\text{cell}$ の数値  
を基に、ヒト血液の受容体FPRの推定量は $0.68 \sim 1.2 \times 10^{-12} \text{ mol}$   
 $/\text{mL}$ と計算され、ヒトにおけるペプチド/受容体比は $0.03 \sim 0.01$ であっ  
た。 $Tc-99m$ -ペプチド4種及び陰性対照 ( $Tc-99m$ -グルコヘプトン  
酸) のヒト血液内分布の結果を図18に示す。また、 $Tc-99m$ -ペプチド4  
10 種の全白血球の放射エネルギーに対する顆粒球画分の放射エネルギーとリンパ球および単球画  
分の放射エネルギーの百分率を示した結果を表14に示す。 $Tc-99m$ -ペプチド3、  
 $Tc-99m$ -ペプチド11、 $Tc-99m$ -ペプチド12のn数は1、 $Tc-99m$ -ペプチド6のn数は3である。

$Tc-99m$ -ペプチド3は、30分のインキュベーション後顆粒球画分に全  
15 血液中の放射エネルギーの21.91%が分布し、リンパ球および単球画分には39.9  
8%分布した。また、全白血球の放射エネルギーに対して顆粒球画分の放射エネルギーは35.  
41%であり、リンパ球および単球画分の放射エネルギーは64.59%であった。こ  
の結果から、本発明の一部である $Tc-99m$ -ペプチド3は、健常なヒト血液  
において従来技術のペプチド $Tc-99m$ -ペプチド11およびペプチド $Tc-$   
20  $99m$ -ペプチド12よりもリンパ球および単球画分により多く分布していたこ  
とが明らかとなった。

$Tc-99m$ -ペプチド6は、30分のインキュベーション後顆粒球画分に全  
血液中の放射エネルギーの29.45%が分布し、リンパ球および単球画分には6.59%  
分布した。また、全白血球の放射エネルギーに対して顆粒球画分の放射エネルギーは81.9  
25  $4 \pm 8.67\%$ であり、リンパ球および単球画分の放射エネルギーは $18.07 \pm 8.$   
 $67\%$ であった。この結果から、本発明の一部である $Tc-99m$ -ペプチド6  
は、健常なヒト血液において従来技術のペプチド $Tc-99m$ -ペプチド11よ  
りもリンパ球および単球画分により多く分布していたことが明らかとなった。

一方、陰性対照の $Tc-99m$ -グルコヘプトン酸は、30分のインキュベ-

ション後顆粒球画分に全血液中の放射能の 1.11% が分布し、リンパ球および単球画分には 2.52% が分布した。血漿画分には 95.39% が分布した。白血球結合の起こらない陰性対照であるため、全白血球の放射エネルギーに対する顆粒球画分ならびにリンパ球および単球画分の放射エネルギーの割合は算出しない。

- 5     Tc-99m-ペプチド 11 はヒト血液において、30 分のインキュベーション後顆粒球画分に全血液中の 58.70% が分布し、リンパ球および単球画分には 8.02% が分布した。また、全白血球の放射エネルギーに対して顆粒球画分の放射エネルギーは 87.98% であり、リンパ球および単球画分の放射エネルギーは 12.03% であった。
- 10    Tc-99m-ペプチド 12 はヒト血液において、30 分のインキュベーション後顆粒球画分に全血液中の 25.09% が分布し、リンパ球および単球画分には 13.77% が分布した。また、全白血球の放射エネルギーに対して顆粒球画分の放射エネルギーは 64.57% であり、リンパ球および単球画分の放射エネルギーは 35.43% であった。
- 15    以上の結果から、本発明のペプチドは、陰性対照の Tc-99m-グルコヘプトン酸および従来技術である Tc-99m-ペプチド 11 あるいは Tc-99m-ペプチド 12 と比べて、顆粒球への結合よりもリンパ球および単球により強く結合することが示された。また、実施例 4 および実施例 6 の結果を勘案しても、リンパ球および単球が多く浸潤する慢性炎症に本発明のペプチドが有効であること
- 20    が確認された。

表 14. ヒト白血球に対する Tc-99m 標識ペプチドの結合率

(n=3, 平均値±標準偏差値)

標識化合物名	全白血球に対する結合率 (%)	
	顆粒球	リンパ球および単球
Tc-99m-ペプチド 3	35.41 (n=1)	64.59 (n=1)
Tc-99m-ペプチド 6	81.94±8.67	18.07±8.67
Tc-99m-ペプチド 11	87.98 (n=1)	12.03 (n=1)
Tc-99m-ペプチド 12	64.57 (n=1)	35.43 (n=1)

Tc-99m標識されたペプチド3、ペプチド6のラット血液内分布

## (1) 方法

炎症モデル作製：アンソニーらの方法（Anthony et al. Int. J. Exp. Path., 76, 215-224 (1995)）に基づいて、ラット潰瘍性大腸炎モデルを作製した。

5 2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸（TNBS）360mgを純水4mLに溶解し、その後エタノール3.2mL加え、50.0mg/mL 46% エタノール/生理食塩液とした。24時間前に絶食を行ったエーテル麻酔下のSD系ラット（Sprague Dawley、Specific Pathogen Free）雌7週齢（164～184g）の肛門部より、チューブを7～8cm挿入

10 し、空気を0.1mL注入した。次に、TNBS/46% エタノール/生理食塩液を0.2mL注入し、2分間マッサージおよび体位変更を行った。これを3日連続して行い、最終投与日の4日後に実験に供し、血液を採取した。採取した血液2mLを37℃湯浴中にて5分加温した。続いてHPLC精製を行ったTc-99m-ペプチド3、Tc-99m-ペプチド6の試料液 3μL（111MBq/mL、Tc-99m-ペプチドとして $1.8 \times 10^{-11}$ mol/mL）を加えた後、30分インキュベーションを行った。その血液試料を調製したPercol 1比重勾配液に静かに重層した。2000rpm（800×g）15分間の遠心分離を行い、分離後チューブを凍結させた後、各画分をカッターで切断し、それぞれをオートウェルガンマカウンターにて放射エネルギーを測定し、Tc-99m-ペプチド3、Tc-99m-ペプチド6の血液に占める各成分の放射能分布を求めた。

20

## (2) 結果

ラット雌の血液学的パラメーターから白血球数6600～12600cell/μL、文献でみられる受容体FPR数100,000～120,000/cellの数値を基に、ラット血液の受容体FPRの推定量は $1.1 \sim 2.5 \times 10^{-12}$ mol/mLと計算され、ラットにおけるペプチド/受容体比は0.02～0.05であった。全血液中の放射エネルギーに対する各血液成分の放射エネルギーの百分率を示した結果を図19に示す。また、全白血球の放射エネルギーに対する顆粒球画分の放射エネルギーとリンパ球および単球画分の放射エネルギーの百分率を示した結果を表15に示す。TNBSによる潰瘍性大腸炎モデルのラット血液において、Tc-99m-ペプチド3、Tc-99m-ペプチド6の血液に占める各成分の放射能分布を求めた。

25

9 m-ペプチド3は、30分のインキュベーション後顆粒球画分に全血液中の放射能の7.82%が分布し、リンパ球および単球画分には10.00%分布した。

また、全白血球の放射エネルギーに対して顆粒球画分の放射エネルギーは43.69%であり、リンパ球および単球画分の放射エネルギーは56.31%であった。Tc-99m-

- 5 ペプチド6は、30分のインキュベーション後顆粒球画分に全血液中の放射能の18.34%が分布し、リンパ球および単球画分には6.57%分布した。また、全白血球の放射エネルギーに対して顆粒球画分の放射エネルギーは74.08%であり、リンパ球および単球画分の放射エネルギーは25.92%であった。

- これらの結果から、本発明の一部であるTc-99m-ペプチド3およびTc-  
10 99m-ペプチド6は、TNBSによる潰瘍性大腸炎モデルのラット血液において、リンパ球および単球画分にも多く分布していたことが明らかとなった。

以上のことから、本発明のペプチドが、リンパ球および単球が多く浸潤する慢性炎症に本発明のペプチドが有効であることが確認された。

15 表15. ラット白血球に対するTc-99m標識ペプチドの結合率

(全白血球に対する結合率(%) n=2, 平均値±標準偏差値)

標識化合物名	全白血球に対する結合率(%)	
	顆粒球	リンパ球および単球
Tc-99m-ペプチド3	43.69±2.74	56.31±2.74
Tc-99m-ペプチド6	74.08±8.37	25.92±8.37

実施例9

ペプチド3、ペプチド6のTc-99m標識化合物のラット大腸炎モデルによる

20 イメージング、慢性期炎症に対する有用性

(1) 方法

炎症モデル作製：アンソニーらの方法(Anthony et al. Int. J. Exp. Path., 76, 215-224 (1995))に基づいて、ラット潰瘍性大腸炎モデルを作製した。

- 2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS) 360mgを純水4mLに溶解し、その後エタノール3.2mL加え、50.0mg/mL 46%エタノール/生理食塩液とした。24時間前に絶食を行ったエーテル麻酔下のSD系ラ
- 25

ット (Splague Dawley, Specific Pathogen Free) 雌 7 週 齡 (1 6 4 ~ 1 8 4 g) の肛門部より、チューブを 7 ~ 8 cm 挿入し、空気を 0.1 mL 注入した。次に、TNBS / 4 6 % エタノール / 生理食塩液を 0.2 mL 注入し、2 分間マッサージおよび体位変更を行った。これを 3 日連続して行い、最終投与日の 4 日後に実験実験に供した。実

5 施例 2 で得られた T c - 9 9 m - ペプチド 3、T c - 9 9 m - ペプチド 6 をそれぞれ 1 匹あたり約 3 7 MB q の放射エネルギーで尾静脈内投与し、5 分後、3 0 分後、6 0 分後、1 2 0 分後にガンマカメラにてイメージを撮像した。比較対照として、ヒトにおいて潰瘍性大腸炎を診断するのに利用される T c - 9 9 m 標識白血球をロカらの方法 (M. Roca et al. Eur J Nucl Med 1998 25, 797-799) を基に調製し

10 て、これを 1 匹あたり約 3 7 MB q の放射エネルギーで尾静脈内投与し、5 分後、3 0 分後、6 0 分後、1 2 0 分後にガンマカメラにてイメージを撮像した。T c - 9 9 m 標識白血球は、顆粒球、リンパ球および単球などの全ての白血球を含んで調製された。また撮像終了後、つまり投与後 1 3 0 分にて腹部大動脈より脱血した後、各臓器を取り出し、重量および放射エネルギーをそれぞれ測定し、組織 1 g あたり

15 の放射エネルギー (% I D / g) を算出した。さらに算出された数値を用いて [炎症] / [筋肉] 比 ( [A] / [M] 比 ) , [炎症] / [血液] 比 ( [A] / [B L] 比 ) , [炎症] / [骨] 比 ( [A] / [B O] 比 ) , [炎症] / [盲腸] 比 ( [A] / [A P] 比 ) , [炎症] / [結腸] 比 ( [A] / [C] 比 ) , [炎症] / [直腸] 比 ( [A] / [R] 比 ) を求めた。

## 20 (2) 結果

得られた結果の代表図を、図 2 0、図 2 1 及び図 2 2 に示す。イメージ上に關心領域を設定し、全身カウントに対する各關心領域 1 画素あたりのカウントの割合 (% 投与量 / p i x e l) を求めた結果を表 1 6 に示す。また、その割合から

[炎症] / [腹部バックグラウンド] 比 ( [A] / [B G] 比 ) を求めた結果を

25 表 1 7 に示す。さらに解剖の結果得られた炎症の % I D / g, [A] / [M] 比, [A] / [B L] 比, [A] / [B O] 比, [A] / [A P] 比, [A] / [C] 比, [A] / [R] 比を表 1 8 および図 2 3 に示した。その結果、比較対照の T c - 9 9 m 標識白血球は、投与後 3 0 分の % 投与量 / p i x e l は 0. 1 1 1 ± 0. 0 2 5 (以下平均値 ± 標準誤差の順で示す) (n = 5)、[A] /



[BG] 比は  $3.21 \pm 1.96$  ( $n=5$ ) を示した。また投与後 130 分に脱血し解剖を行った結果得られた炎症 1 g あたりの放射エネルギー (%ID/g) は  $0.71 \pm 0.33$  であったが、[A] / [BO] 比は  $2.08 \pm 1.37$  を示し、また [A] / [BL] 比は  $0.25 \pm 0.17$  を示し、炎症よりも血液に多く分布していた。

これに対し、本発明である Tc-99m-ペプチド 3 は、投与後 30 分の %投与量 / pixel は  $0.043 \pm 0.015$  ( $n=5$ )、[A] / [BG] 比は  $2.23 \pm 0.77$  ( $n=5$ ) を示した。また投与後 130 分に脱血し解剖を行った結果得られた炎症 1 g あたりの放射エネルギー (%ID/g) は  $0.13 \pm 0.12$  であったが、[A] / [BO] 比は  $3.40 \pm 2.78$  を示し、また [A] / [BL] 比は  $2.33 \pm 2.22$  を示した。これは血液よりも炎症部位により多く放射エネルギーが分布していることを示している。また、Tc-99m-ペプチド 6 は、投与後 30 分の %投与量 / pixel は  $0.093 \pm 0.048$  ( $n=5$ )、[A] / [BG] 比は  $2.15 \pm 0.53$  ( $n=5$ ) を示した。また投与後 130 分に脱血し解剖を行った結果得られた炎症 1 g あたりの放射エネルギー (%ID/g) は  $0.55 \pm 0.51$  であったが、[A] / [BO] 比は  $4.44 \pm 2.74$  を示し、また [A] / [BL] 比は  $2.88 \pm 1.61$  を示した。これはペプチド 3 と同様に血液よりも炎症部位により多く放射エネルギーが分布していることを示している。これらのことより比較対照の Tc-99m 標識白血球よりも、血液の影響を受けやすい、肝臓、脾臓、心臓、腎臓、脳、骨などの血流の多い臓器において特に炎症の描出に優れていると判断された。特にペプチド 6 は、[A] / [M] 比、[A] / [BL] 比、[A] / [BO] 比、[A] / [AP] 比、[A] / [C] 比、[A] / [R] 比において、比較対照の Tc-99m 標識白血球よりも優れた数値を示し、本発明のペプチドが、慢性炎症である潰瘍性大腸炎においても優れていることが確認された。

表 16. FMLP 阻害有無による、ラット大腸炎モデルにおける

Tc-99m 標識ペプチドの炎症集積 (%ID/pixel)

(n=5, 平均値±標準偏差値)

	投与後経過時間			
	5 分	30 分	1 時間	2 時間
Tc-99m- ペプチド 3	0.057±0.011	0.043±0.015	0.035±0.014	0.031±0.016
Tc-99m- ペプチド 6	0.165±0.066	0.093±0.048	0.071±0.050	0.069±0.055
Tc-99m- 白血球	0.120±0.032	0.111±0.025	0.102±0.031	0.111±0.043

5 表 17. FMLP 阻害有無による、ラット大腸炎モデルにおける Tc-99m 標識ペプチドと Tc-99m-白血球の炎症/腹部バックグラウンド比

(n=5, 平均値±標準偏差値)

	投与後経過時間			
	5 分	30 分	1 時間	2 時間
Tc-99m- ペプチド 3	1.84±0.41	2.23±0.77	3.67±1.68	5.87±3.20
Tc-99m- ペプチド 6	2.64±0.42	2.15±0.53	1.90±0.33	2.73±0.52
Tc-99m- 白血球	3.23±1.50	3.21±1.96	3.23±1.73	3.71±2.17

表 18. ラット大腸炎モデルにおける Tc-99m 標識ペプチドと

10 Tc-99m-白血球の解剖による解析結果

(n=5, 平均値±標準偏差値)

炎症/臓器比	Tc99m-ペプチド 3	Tc99m-ペプチド 6	Tc99m-白血球
炎症/筋肉比	10.37 ± 9.54	15.66 ± 11.17	12.12 ± 5.97
炎症/血液比	2.33 ± 2.22	2.88 ± 1.61	0.25 ± 0.17
炎症/骨比	3.40 ± 2.78	4.44 ± 2.74	2.08 ± 1.37
炎症/盲腸比	8.75 ± 8.09	13.49 ± 7.75	11.99 ± 4.18
炎症/結腸比	2.10 ± 0.83	3.53 ± 2.06	3.03 ± 2.03
炎症/直腸比	1.68 ± 0.87	2.79 ± 1.99	2.73 ± 1.50
炎症(%ID/g)	0.13 ± 0.12	0.55 ± 0.51	0.71 ± 0.33

## 実施例 10

ペプチド6、ペプチド14のTc-99m標識化合物のラット大腸炎モデルによるオートラジオグラフィ、慢性期炎症に対する有用性

## (1) 方法

- 5 アンソニーらの方法 (Anthony et al. Int. J. Exp. Path., 76, 215-224 (1995)) に基づいて、ラット潰瘍性大腸炎モデルを作製した。2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 360mgを純水4mLに溶解し、その後エタノール3.2mL加え、50.0mg/mL 46% エタノール/生理食塩液とした。24時間前に絶食を行ったエーテル麻酔下のSD系ラット (Splague
- 10 Dawley, Specific Pathogen Free) 雌7週齢 (164~184g) の肛門部より、チューブを7~8cm挿入し、空気を0.1mL注入した。次に、TNBS/46% エタノール/生理食塩液を0.2mL注入し、2分間マッサージおよび体位変更を行った。これを3日連続して行い、最終投与日の4日後に実験実験に供した。実施例2で得られたTc-99m-ペプチド6、Tc-99m-ペプチド14をそれぞれ1匹あたり
- 15 約74MBqの放射能量で尾静脈内投与し、120分後に脱血および屠殺を行った。直ちに大腸を摘出し、内容物を取り除いた後、肉眼的評価にて炎症部位と判断される個所を凍結切片作製用のメディウムに包埋した。その後直ちに液体窒素内に容器と共に数十秒間浸して、大腸炎切除部位を含むメディウムを凍結した。
- 20 -20℃の冷凍庫に数十分間静置した後、クリオスタットにて凍結切片の作成を行った。切片作製後、オートラジオグラフィ用イメージングプレート (富士フィルム社製) に12から19時間密着した。続いてイメージングアナライザーBAS 2500 (富士フィルム社製) にて放射能分布を画像化した。また、同様に作製した凍結切片を顆粒球抗体および単球抗体の免疫組織化学染色を行い、顆粒球および単球の組織への浸潤を確認した。

## 25 (2) 結果

得られた結果の代表的な図を図24、図25、図26に示す。また、オートラジオグラフィの結果から得られたイメージ上に関心領域を設定し、各関心領域1画素あたりのカウントを求め、それを基に〔炎症〕/〔正常組織〕比 (〔A〕/〔N〕比) を求めた結果を図27に示す。

起炎を施したラットは、直腸部に2 cmから4 cm幅の炎症が腸管全周に形成されており、全てのラットに炎症部位があることを確認した。免疫組織化学染色の結果、炎症部位に顆粒球および単球の著しい浸潤が観察され、顆粒球および単球は炎症部に一致した分布を示した。比較対照のTc-99m標識白血球は、免疫染色像による顆粒球と単球の分布と一致した放射能の分布がみられた。

一方、Tc-99m標識されたペプチド6とペプチド14はどちらも比較対照のTc-99m標識白血球と同様に、免疫染色像による顆粒球と単球の分布と一致した放射能の分布がみられた。同一の切片内で得た[A] / [N] 比を比較対照のTc-99m標識白血球、Tc-99m-ペプチド6およびTc-99m-ペプチド14で比較すると、Tc-99m-ペプチド6およびTc-99m-ペプチド14は比較対照のTc-99m標識白血球よりも高い[A] / [N] 比を示し、本発明のペプチドが、慢性炎症である潰瘍性大腸炎においても優れていることが確認された。

#### 実施例 11

15 ペプチド3、ペプチド4、ペプチド6、ペプチド8、ペプチド9、ペプチド16  
ペプチド17、ペプチド18のリコンビナントヒト受容体結合阻害アッセイ)

##### (1) 方法

CHO細胞由来リコンビナント受容体FPR (6.24pmol/mL, 50mM Tris-HCl pH7.4, 10%glycerol, 1%BSA, BioSignal Packard Inc. アマシャムバイオサイエンス)および $[^3\text{H}]$ -FMLP (fMLF, 9.25MBq/2.88~6.25nmol, 第一化学薬品㈱). を用いて実施した。一定量の受容体FPR (0.05nM, 200 $\mu$ L/well)に各ペプチドを $10^{-4}$ ~ $10^{-14}$ Mの濃度範囲で加えた後、一定量の $[^3\text{H}]$ FMLP (0.3 nM, 25 $\mu$ L/well)を加えた。反応後にGF/Cフィルターにて受容体FPR未結合の $[^3\text{H}]$ -FMLPと受容体FPR結合の $[^3\text{H}]$ -FMLPとを分離し、受容体FPR結合の $[^3\text{H}]$ -FMLPの放射エネルギーを測定することにより、 $[^3\text{H}]$ FMLPの受容体FPRへの結合量を求めた。 $[^3\text{H}]$ FMLPの結合を50%に阻害する各ペプチド濃度(IC<sub>50</sub>)を解析ソフト「Xlfit ver 3.0.3 (CTCラボラトリーシステムズ㈱)」により求め、さらに $[^3\text{H}]$ FMLPのK<sub>d</sub>値から阻害定数(K<sub>i</sub>)を求めた。試験を3回行い、各試験では測定を3回行い、平均値を求めた。

## (2) 結果

得られた結果を図28に示す。また算出された  $IC_{50}$  値および  $K_i$  値を表19に示す。比較対照である FMLP は  $K_i$  値が  $(2.33 \pm 0.45) \times 10^{-10} M$  と算出された。これに対し、ペプチド3は  $K_i$  値が  $(6.50 \pm 1.84) \times 10^{-9} M$ 、ペプチド4は  $K_i$  値が  $(8.36 \pm 3.74) \times 10^{-10} M$ 、ペプチド6は  $K_i$  値が  $(2.83 \pm 1.07) \times 10^{-10} M$ 、ペプチド8は  $K_i$  値が  $(2.33 \pm 0.91) \times 10^{-9} M$ 、ペプチド9は  $K_i$  値が  $(1.28 \pm 0.69) \times 10^{-10} M$  と算出された。またN末端のホルミル基をアセチル基に変えたペプチド16、カルバミル基に変えたペプチド17、メチル基に変えたペプチド18のそれぞれの  $K_i$  値は、 $(3.74 \pm 3.53) \times 10^{-6} M$ 、 $(4.24 \pm 3.60) \times 10^{-7} M$ 、 $(3.83 \pm 1.12) \times 10^{-5} M$  を示し、本発明によるペプチドは、受容体 FPR に対する親和性を有しており、受容体 FPR を発現する白血球を介した炎症診断に有用であることが確認された。

表19. 各ペプチドの50%阻害濃度 ( $IC_{50}$ ) と阻害定数 ( $K_i$ )

(n=9, 平均値±標準偏差値)

	$IC_{50}$ (M)	$K_i$ (M)
FMLP	$(5.67 \pm 1.10) \times 10^{-10}$	$(2.33 \pm 0.45) \times 10^{-10}$
ペプチド3	$(1.58 \pm 0.45) \times 10^{-8}$	$(6.50 \pm 1.84) \times 10^{-9}$
ペプチド4	$(2.03 \pm 0.91) \times 10^{-9}$	$(8.36 \pm 3.74) \times 10^{-10}$
ペプチド6	$(6.87 \pm 2.59) \times 10^{-10}$	$(2.83 \pm 1.07) \times 10^{-10}$
ペプチド8	$(5.65 \pm 2.21) \times 10^{-9}$	$(2.33 \pm 0.91) \times 10^{-9}$
ペプチド9	$(3.10 \pm 1.69) \times 10^{-10}$	$(1.28 \pm 0.69) \times 10^{-10}$
ペプチド12	$(7.40 \pm 5.03) \times 10^{-11}$	$(3.05 \pm 2.07) \times 10^{-11}$
ペプチド16	$(9.08 \pm 8.58) \times 10^{-6}$	$(3.74 \pm 3.53) \times 10^{-6}$
ペプチド17	$(1.03 \pm 0.88) \times 10^{-6}$	$(4.24 \pm 3.60) \times 10^{-7}$
ペプチド18	$(9.29 \pm 2.71) \times 10^{-5}$	$(3.83 \pm 1.12) \times 10^{-5}$

15

## 実施例12

ペプチド6のTc-99m標識化合物のウサギ感染症モデルによる阻害イメージング、生体内での白血球結合の確認

## (1) 方法

20 黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus) の約  $10^8$  個の生菌を生理食塩液

1 mLに懸濁させ、その内の100  $\mu$  lをニュージーランドホワイト (NZW) 系ウサギ2 kg前後の右ふくらはぎに筋肉内投与し、24時間経過後、明らかに炎症が認められたモデルウサギにペントバルビタール麻酔を施した。実施例2で得られたテクネチウム-99mで標識したペプチド6を約74 MBqの投与放射  
5 能量で耳静脈内投与し、投与後5分、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間にガンマカメラにてイメージを撮像した。ペプチド6の炎症集積が、FMLPにより阻害されるか確認するために設定したFMLPプレ投与群では、推定受容体最大量0.1 nmol/kgの約1万倍に相当するFMLP 1 mgを5% DMSO/生理食塩水に溶解し、これをFMLP溶液として、テクネチウム-99mで標  
10 識したペプチド6の投与の5分前に耳静脈より投与した。FMLPを投与していない群と同様に投与後5分、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間にガンマカメラにてイメージを撮像した。

## (2) 結果

得られた結果の代表図を、図29及び図30に示す。イメージ上に関心領域を  
15 設定し、全身カウントに対する各関心領域1000画素あたりのカウントの割合(%投与量/K pixel)を求めた結果を表20に示す。また、その割合から[炎症] / [正常筋肉] 比 ([A] / [M] 比)を求めた結果を表21に示す。その結果、FMLP阻害無しのTc-99m-ペプチド6は、投与後2時間の炎症部位への集積は $1.77 \pm 0.25$  %投与量/K pixel (以下平均値 $\pm$ 標準  
20 誤差の順で示す) (n=3)であり、投与後5時間では $2.62 \pm 0.25$  %投与量/K pixelと増加し、[A] / [M] 比も投与後2時間の $12.78 \pm 6.14$  から投与後5時間の $21.39 \pm 5.39$ と増加していた。一方、FMLP阻害有りのTc-99m-ペプチド6は、[A] / [M] 比は投与後2時間の $3.93 \pm 0.60$ と「FMLP阻害無し」と比べて低く、投与後5時間の $9.05 \pm 3.10$ と増加していたものの、炎症部位への集積は投与後2時間の $0.41 \pm 0.10$  %投与量/K pixelから、投与後5時間では $0.30 \pm 0.04$  %投与量/K pixelと減少した。

このことは、本発明の一部であるペプチド6が白血球に存在する受容体FPRに結合することにより、炎症部位を描出していることが確認され、本発明のペプ

チドの集積は白血球浸潤を伴う炎症が起きていることを示していると考えられた。

表 20. FMLP 阻害有無による、ウサギ感染症モデルにおける

Tc-99m 標識ペプチド 6 の炎症集積 (% ID / K p i x e l)

5

(n=3, 平均値±標準偏差値)

	投与後経過時間					
	5 分	1 時間	2 時間	3 時間	4 時間	5 時間
FMLP 阻 害無し	1.74 ± 0.22	1.59 ± 0.32	1.77 ± 0.25	2.01 ± 0.29	2.32 ± 0.56	2.62 ± 0.55
FMLP 阻 害有り	2.01 ± 0.43	0.75 ± 0.18	0.41 ± 0.10	0.31 ± 0.06	0.30 ± 0.03	0.30 ± 0.04

表 21. FMLP 阻害有無による、ウサギ感染症モデル

における Tc-99m 標識ペプチド 6 の炎症 / 筋肉比

(n=3, 平均値±標準偏差値)

	投与後経過時間					
	5 分	1 時間	2 時間	3 時間	4 時間	5 時間
FMLP 阻 害無し	2.25 ± 0.46	6.18 ± 2.99	12.78 ± 6.14	14.53 ± 5.07	17.87 ± 5.46	21.39 ± 5.39
FMLP 阻 害有り	1.81 ± 0.19	2.62 ± 0.43	3.93 ± 0.60	6.42 ± 1.03	8.58 ± 2.60	9.05 ± 3.10

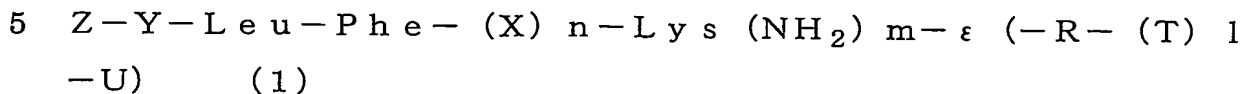
10

#### 産業上の利用の可能性

本発明により、生体内外ですべての白血球、すなわち好中球、単球、リンパ球  
 に対して特異的な結合性を示し、かつ放射性金属または常磁性金属で標識可能な  
 化合物、該標識化合物を有効成分とする SPECT 画像診断、PET 画像診断、  
 15 MRI 画像診断に有用な医薬組成物の提供が可能となり、個体の免疫応答反応を  
 伴う白血球浸潤の盛んな部位のイメージングを行う画像診断が可能となった。

## 請求の範囲

## 1. 下記式 (1)



(式 (1) 中、Zはアミノ基の保護基を表し；

YはMetまたはNleを表し；

- 10 (X)<sub>n</sub>において、Xは1個もしくはそれ以上のアミノ酸および／または有機合成可能な化合物よりなるスペーサー、nは1または0を表し；

(NH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>において、NH<sub>2</sub>はLysのα位のカルボキシル基の保護基としてのアミド基、mは1または0を表し；

- ε(-R-(T)<sub>1</sub>-U)において、RはLysのε-アミノ基にアミド結合したSerまたはThr、Tは1個もしくはそれ以上のアミノ酸および／または有機合成可能な化合物よりなるスペーサー、1は1または0、Uは金属標識可能な基を表し；

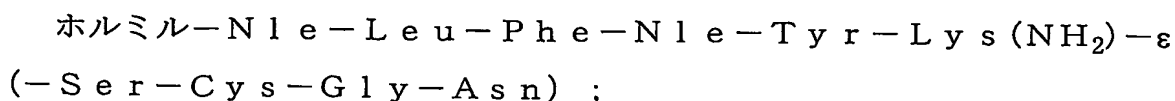
但し、前記XとTは同じでも異なってもよい)

で表される白血球結合性化合物。

- 20 2. 式 (1) のUが-Cys-A1-A2 (A1およびA2はCysおよびProを除くアミノ酸) で表されるペプチドからなる金属標識可能な基である請求項1記載の白血球結合性化合物。

3. 式 (1) のUが炭素数8から20の窒素含有環状化合物、炭素数8から20の窒素含有環状カルボン酸化合物、炭素数8から20の窒素含有環状カルボン酸化合物の誘導体または炭素数4から10のアルキレンアミンカルボン酸から構成される金属標識可能な基である請求項1記載の白血球結合性化合物。

4. 式 (1) で表される白血球結合性化合物が、





ホルミル-N l e-L e u-P h e-N l e-T y r-L y s (NH<sub>2</sub>)-ε (-  
S e r-C y s-A s p-A s p) ;

ホルミル-N l e-L e u-P h e-N l e-T y r-L y s (NH<sub>2</sub>)-ε (-  
S e r-C y s-G l y-A s p) ;

- 5   ホルミル-N l e-L e u-P h e-N l e-T y r-L y s (NH<sub>2</sub>)-ε (-  
S e r-D-A r g-A s p-C y s-A s p-A s p) ;

ホルミル-N l e-L e u-P h e-N l e-T y r-L y s (NH<sub>2</sub>)-ε (-  
S e r-1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン-1, 4, 8, 11-テト  
ラ酢酸) ;

- 10   ホルミル-N l e-L e u-P h e-L y s (NH<sub>2</sub>)-ε (-S e r-D-S e  
r-A s n-D-A r g-C y s-A s p-A s p) ;

ホルミル-N l e-L e u-P h e-N l e-T y r-L y s (NH<sub>2</sub>)-ε (-  
S e r-D-A r g-ジエチレントリアミンペンタ酢酸) ;

- 15   ホルミル-N l e-L e u-P h e-N l e-T y r-L y s (NH<sub>2</sub>)-ε (-  
S e r-1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン-酪酸) ;

ホルミル-N l e-L e u-P h e-N l e-T y r-L y s (NH<sub>2</sub>)-ε (-  
S e r-D-A r g-A s p-1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン  
-酪酸) ;

- 20   ホルミル-N l e-L e u-P h e-N l e-T y r-L y s (NH<sub>2</sub>)-ε (-  
S e r-D-S e r-A s n-1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン  
-酪酸) ;

アセチル-N l e-L e u-P h e-N l e-T y r-L y s (NH<sub>2</sub>)-ε (-  
S e r-D-A r g-A s p-C y s-A s p-A s p) ;

- 25   カルバミル-N l e-L e u-P h e-N l e-T y r-L y s (NH<sub>2</sub>)-ε  
(-S e r-D-A r g-A s p-C y s-A s p-A s p) および

メチル-N l e-L e u-P h e-N l e-T y r-L y s (NH<sub>2</sub>)-ε (-S  
e r-D-A r g-A s p-C y s-A s p-A s p)

よりなる群から選ばれる1である請求項1または2に記載の白血球結合性化合物。

5. 請求項1から4のいずれかに記載の白血球結合性化合物を放射性金属また

は常磁性金属で標識してなる標識化合物を有効成分とする医薬組成物。

6. 放射性金属が、Tc-99m、In-111、Ga-67、である請求項5に記載の医薬組成物。

7. 個体の免疫応答反応を伴う白血球浸潤の盛んな部位のイメージングを行う  
5 SPECT画像診断のための請求項6に記載の医薬品組成物。

8. 放射性金属が、Cu-64またはGa-68である請求項5に記載の医薬組成物。

9. 個体の免疫応答反応を伴う白血球浸潤の盛んな部位のイメージングを行う  
PET画像診断のための請求項8に記載の医薬組成物。

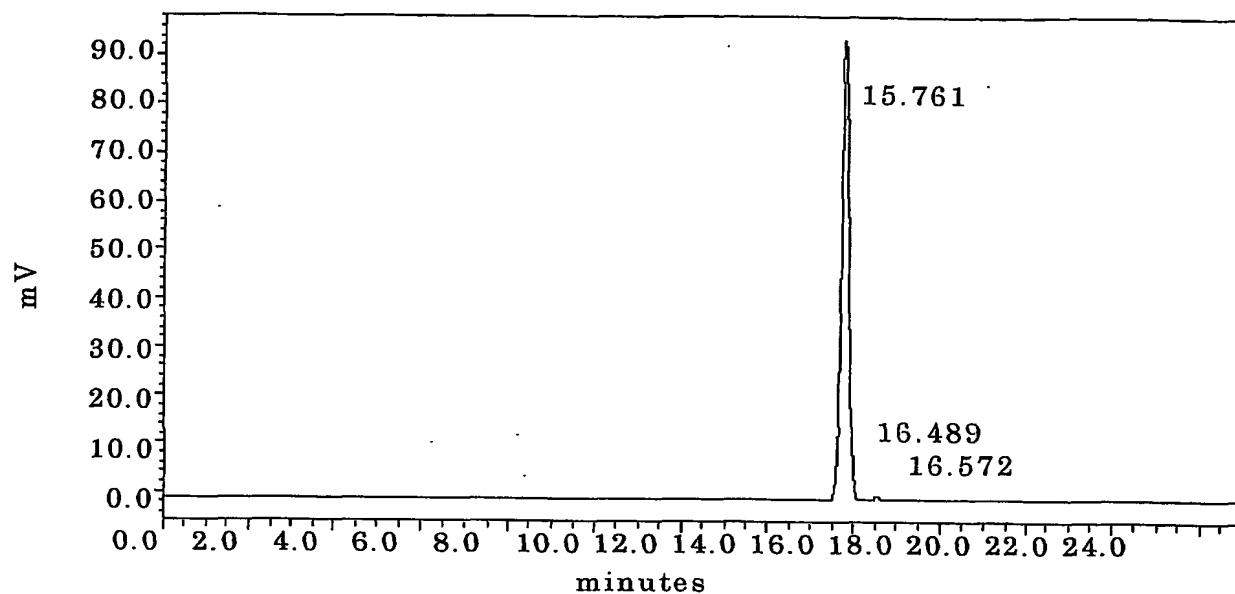
10 10. 常磁性金属がGd、Fe、MnまたはCuである請求項5に記載の医薬品組成物。

11. 個体の免疫応答反応を伴う白血球浸潤の盛んな部位のイメージングを行うMRI画像診断を行うための請求項10に記載の医薬品組成物。

12. 放射性金属が、Y-90、Sn-117m、Sm-153、Re-186ま  
15 たはRe-188である請求項5に記載の医薬組成物。

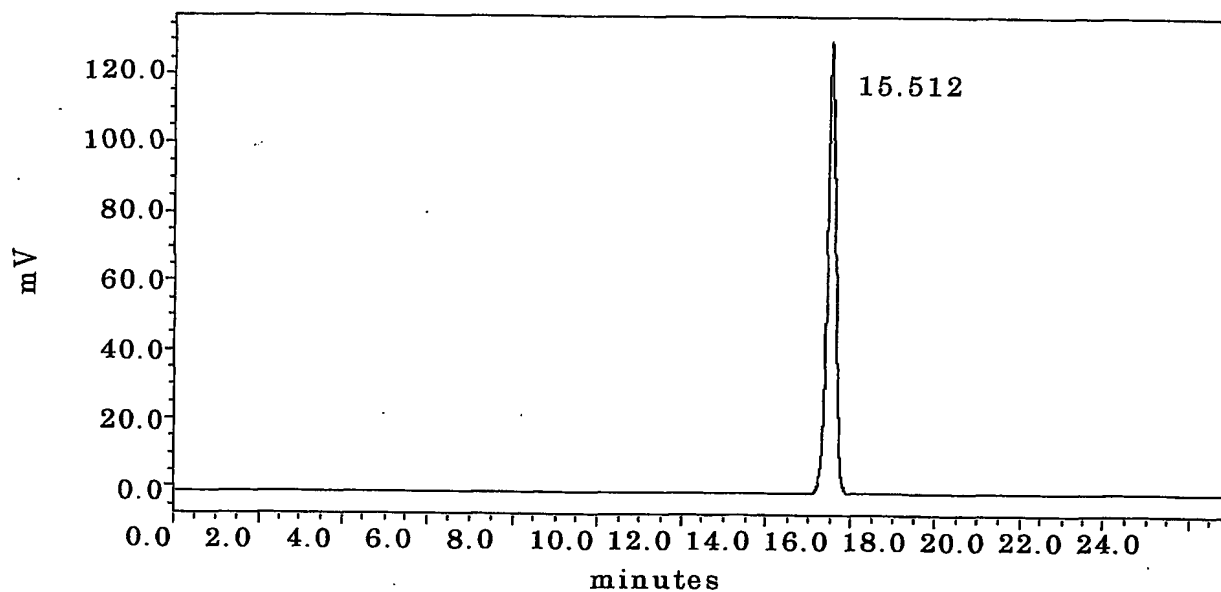
13. 放射性治療のための請求項12に記載の医薬品組成物。

FIG.1



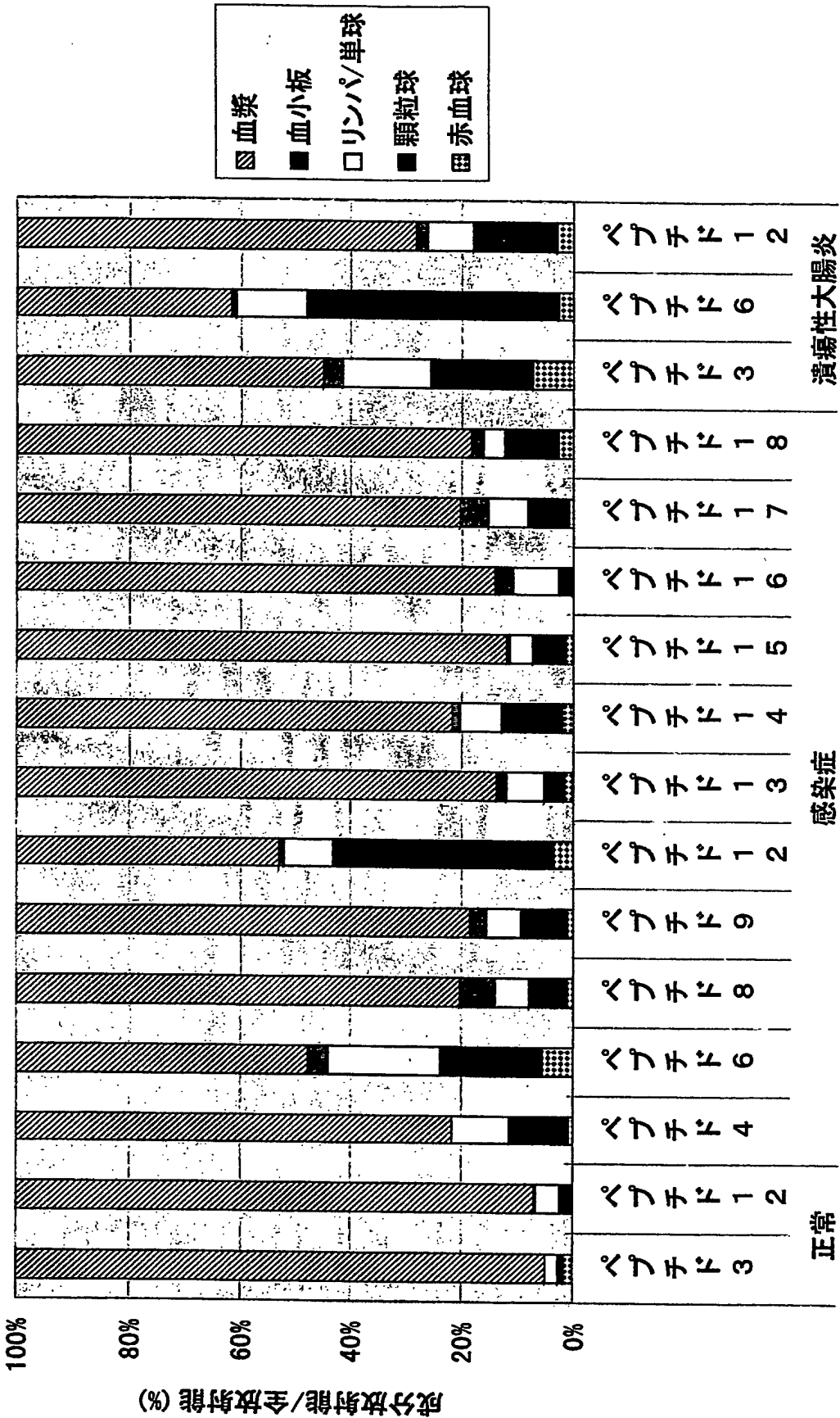
T c 9 9 m -ペプチド 4 の H P L C チャート

FIG.2



T c 9 9 m -ペプチド 6 の H P L C チャート

FIG. 3



T c c - 9 9 m - ペプチドのウサギ血液内分布

FIG.4

(投与後 2 時間)



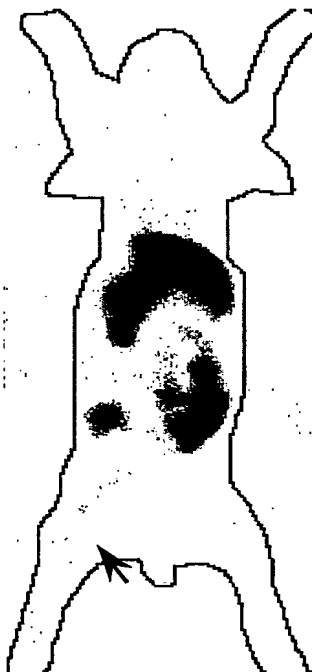
(投与後 2 2 時間)



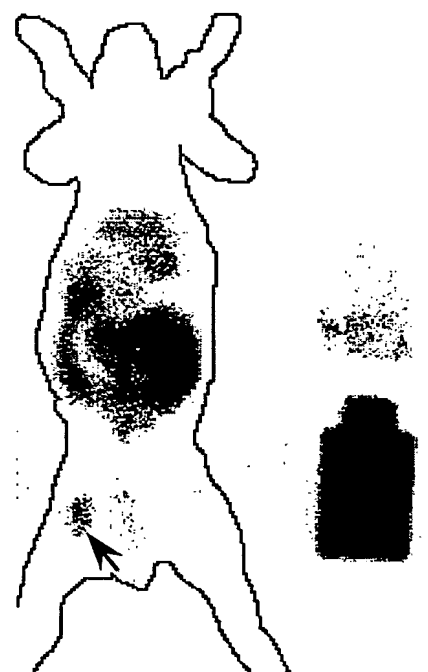
Tc-99m-ペプチド3のウサギ感染症モデルにおけるイメージ

FIG.5

(投与後 2 時間)



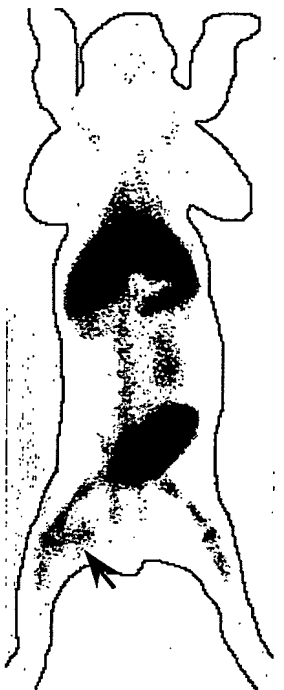
(投与後 2 2 時間)



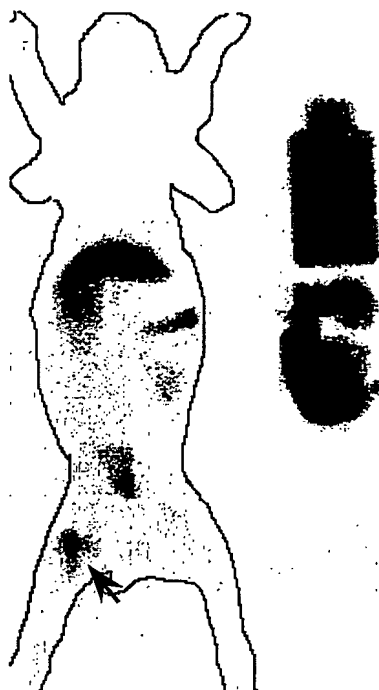
Tc-99m-ペプチド4のウサギ感染症モデルにおけるイメージ

FIG.6

(投与後 2 時間)



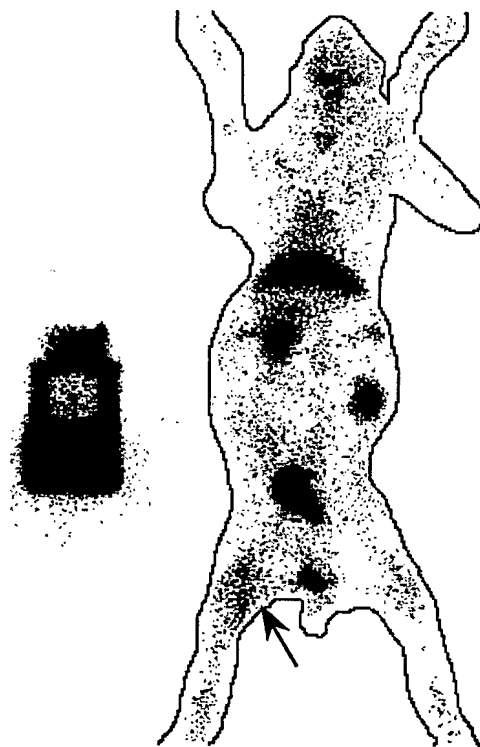
(投与後 2 2 時間)



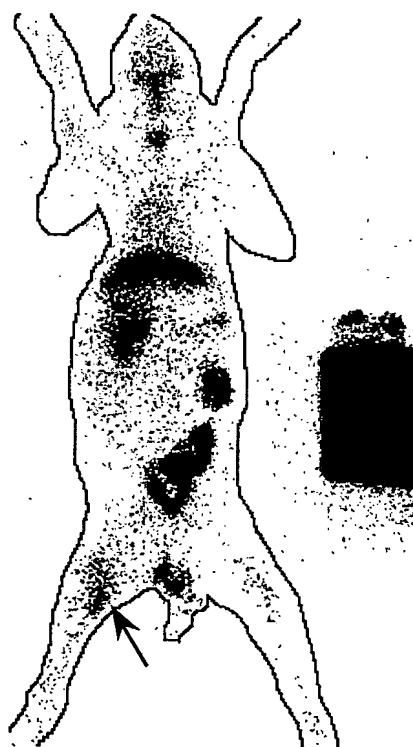
T c - 9 9 m - ペプチド 6 のウサギ感染症モデルにおけるイメージ

FIG.7

(投与後 2 時間)



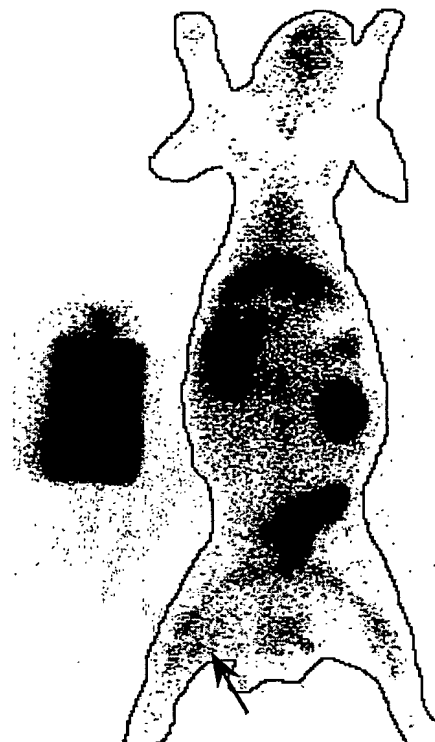
(投与後 5 時間)



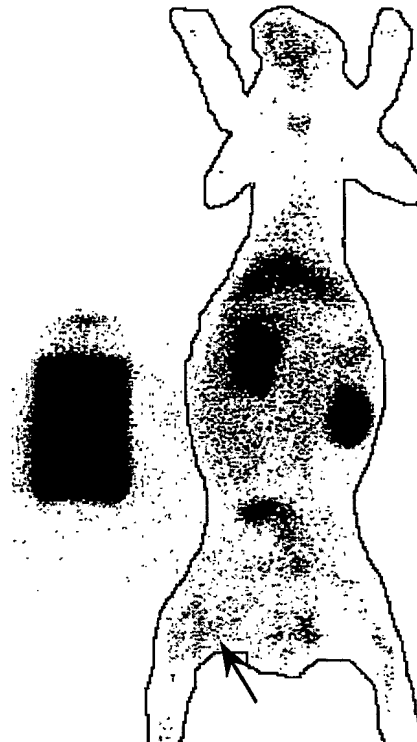
T c - 9 9 m - ペプチド 8 のウサギ感染症モデルにおけるイメージ

FIG.8

(投与後 2 時間)



(投与後 5 時間)



T c - 9 9 m - ペプチド 9 のウサギ感染症モデルにおけるイメージ

FIG.9

(投与後 2 時間)



(投与後 2 2 時間)

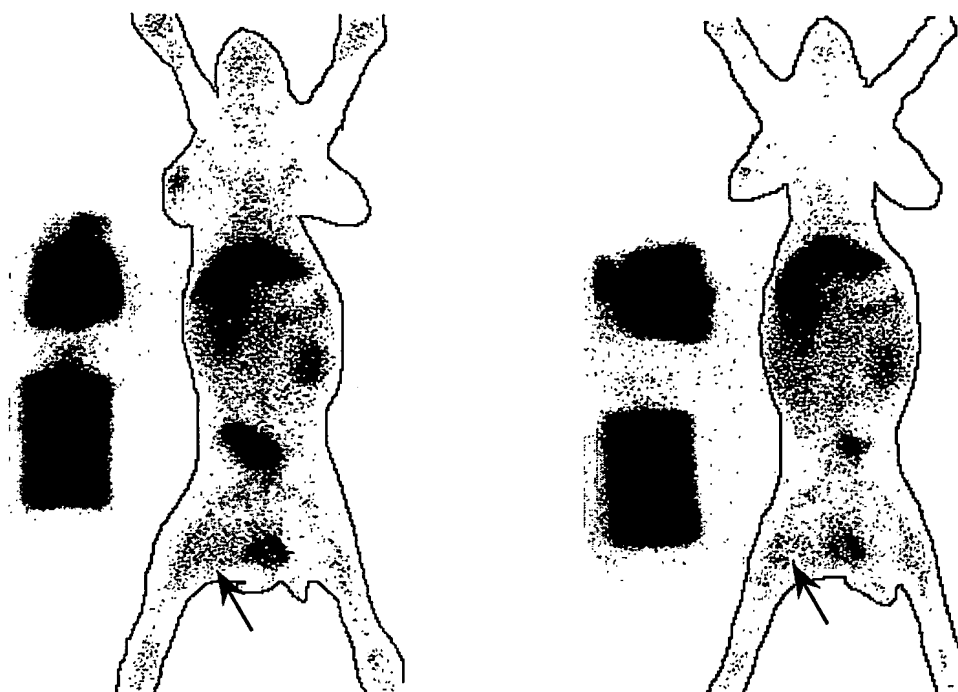


T c - 9 9 m - ペプチド 1 2 のウサギ感染症モデルにおけるイメージ

FIG.10

(投与後 2 時間)

(投与後 5 時間)



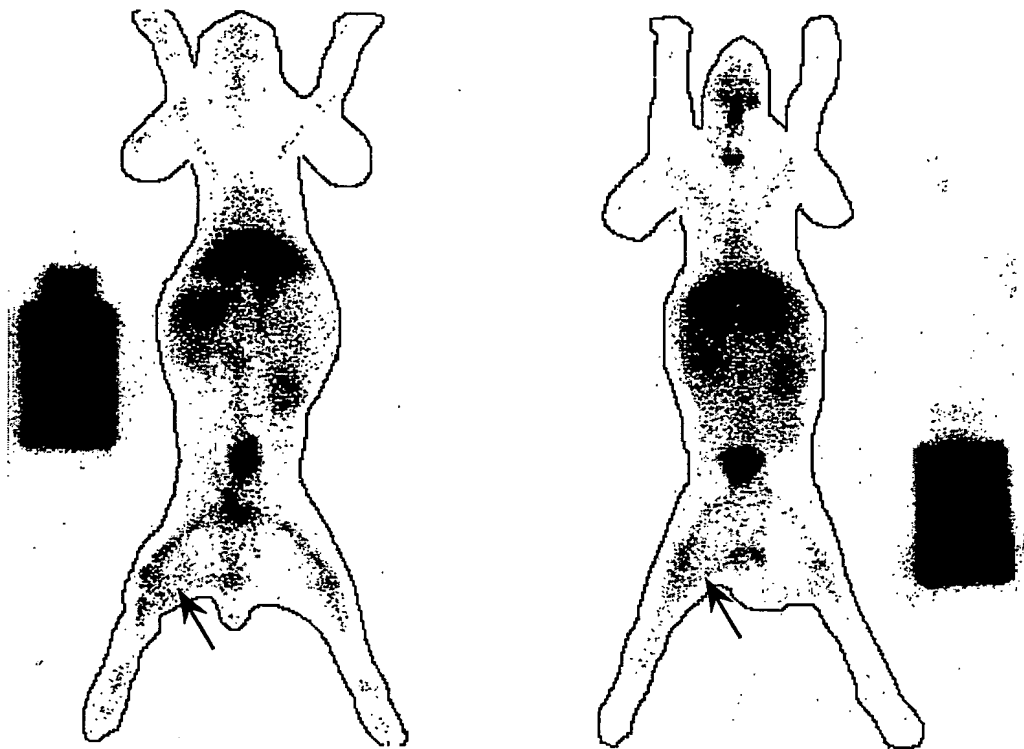
Tc-99m-ペプチド13のウサギ感染症モデルにおけるイメージ



FIG.11

(投与後 2 時間)

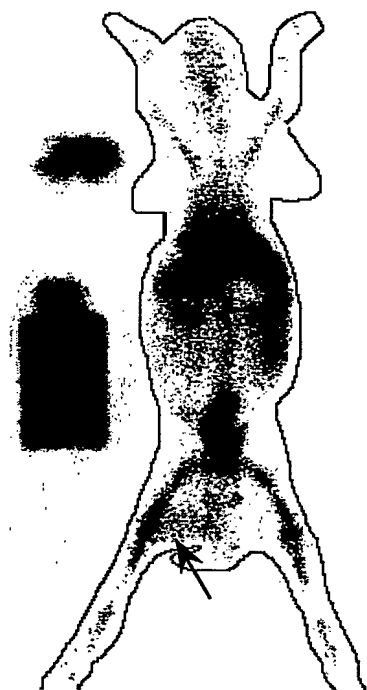
(投与後 5 時間)



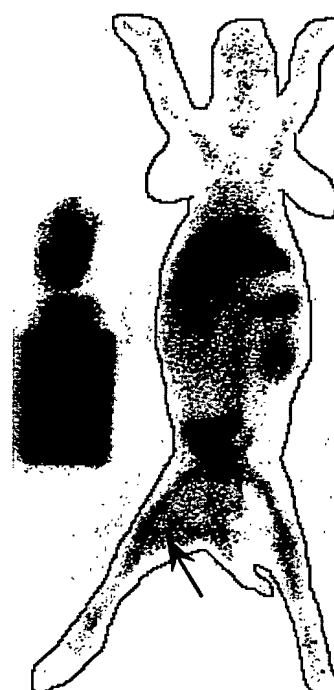
Tc-99m-ペプチド14のウサギ感染症モデルにおけるイメージ

FIG.12

(投与後 2 時間)



(投与後 5 時間)

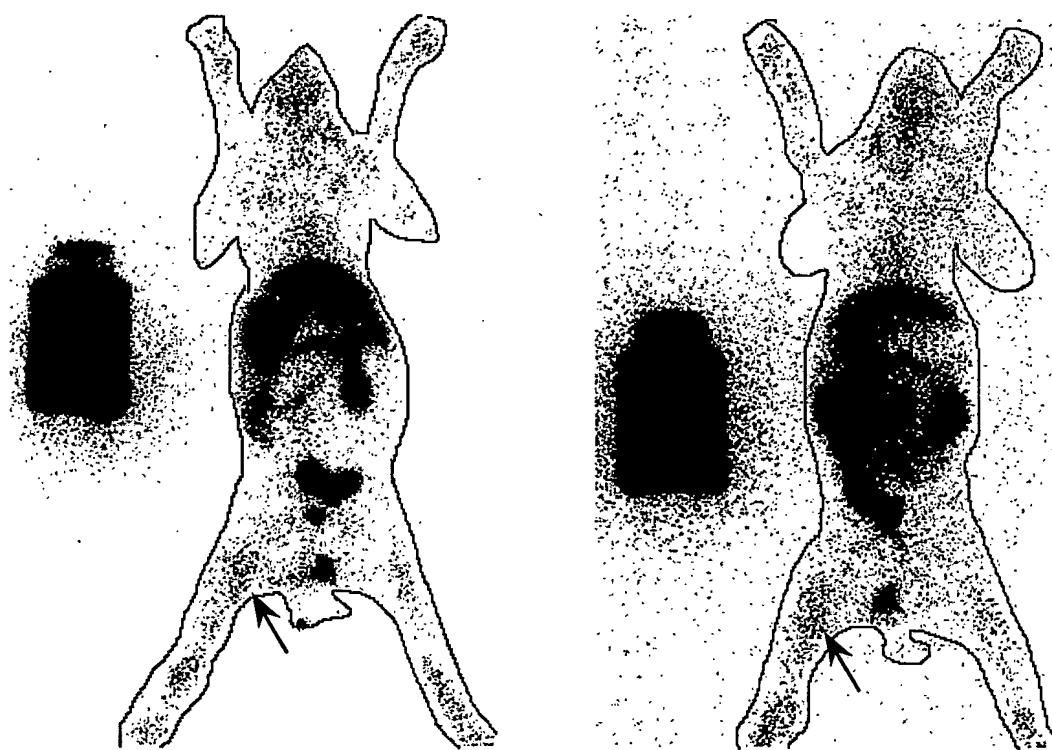


ウサギ感染症モデルにおける T c 9 9 m - ペプチド 1 5 のイメージ

FIG.13

(投与後 2 時間)

(投与後 5 時間)

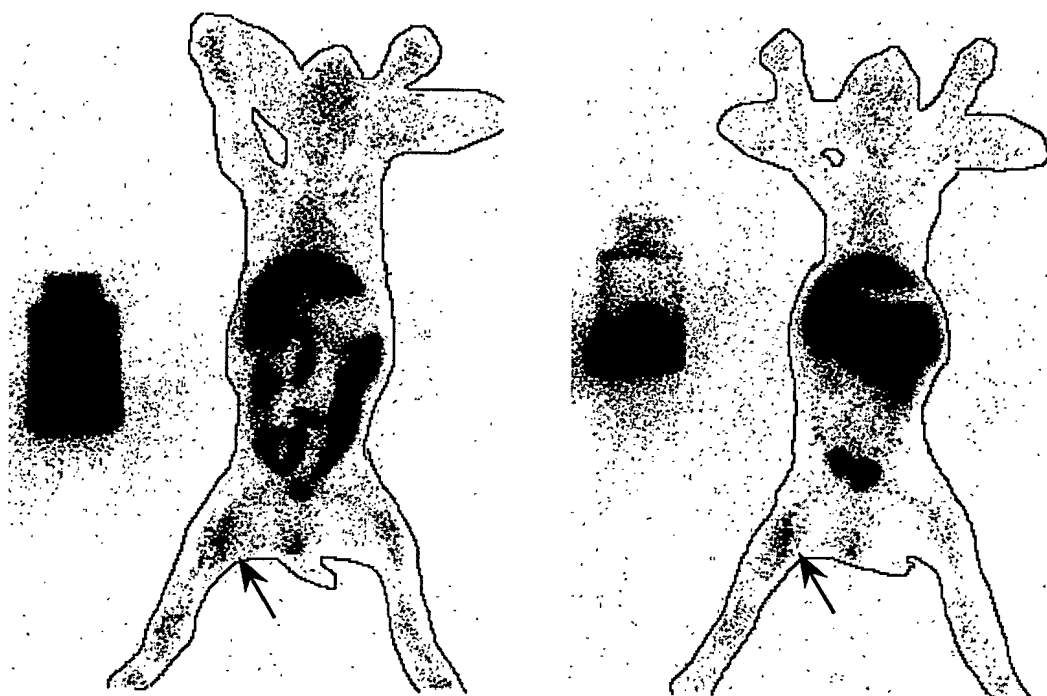


ウサギ感染症モデルにおける T c 9 9 m - ペプチド 1 6 のイメージ

FIG.14

(投与後 2 時間)

(投与後 5 時間)

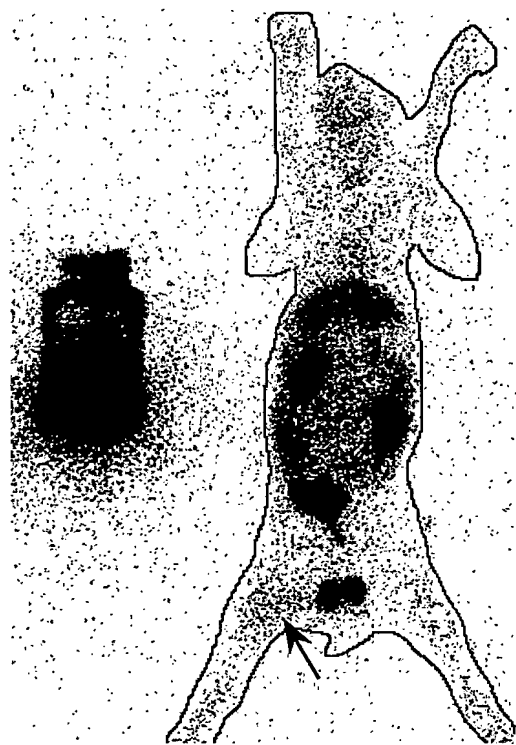


ウサギ感染症モデルにおける Tc 99m-ペプチド 17 のイメージ

FIG.15

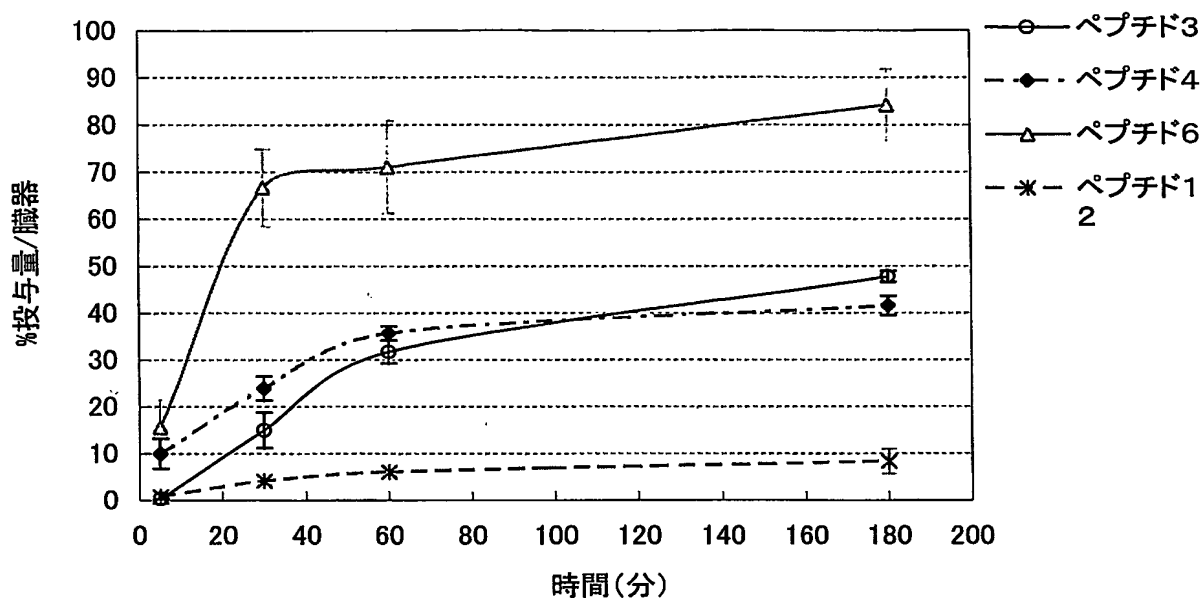
(投与後 2 時間)

(投与後 5 時間)



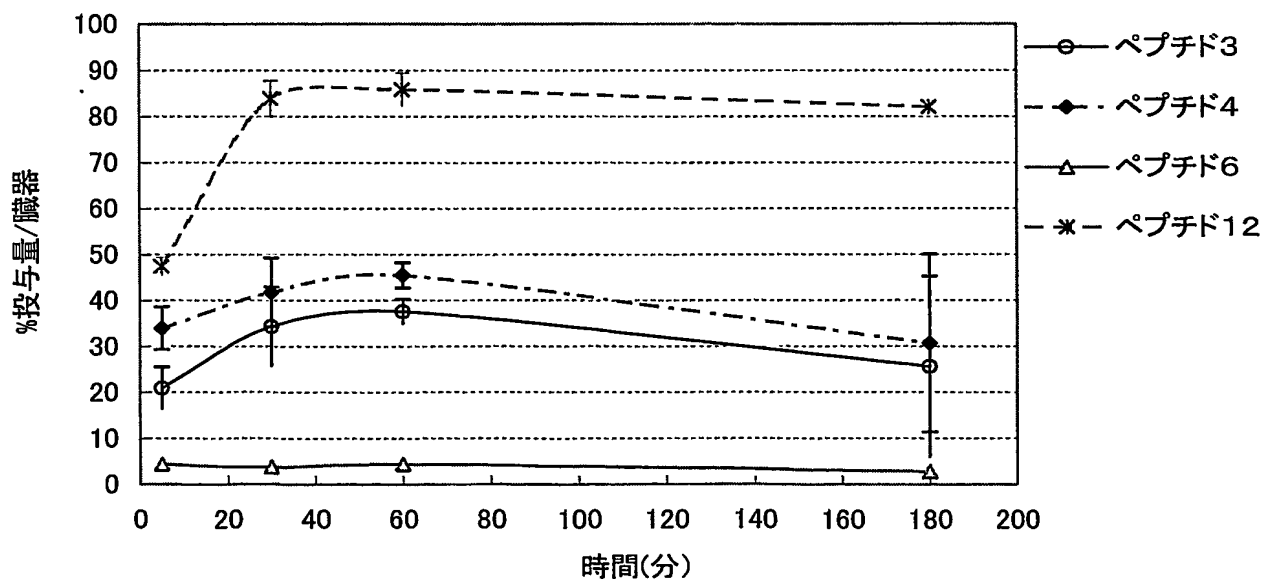
ウサギ感染症モデルにおける T c 9 9 m - ペプチド 1 8 のイメージ

FIG.16



正常ラットにおける T c - 9 9 m - ペプチドの尿排泄の経時変化を示す図

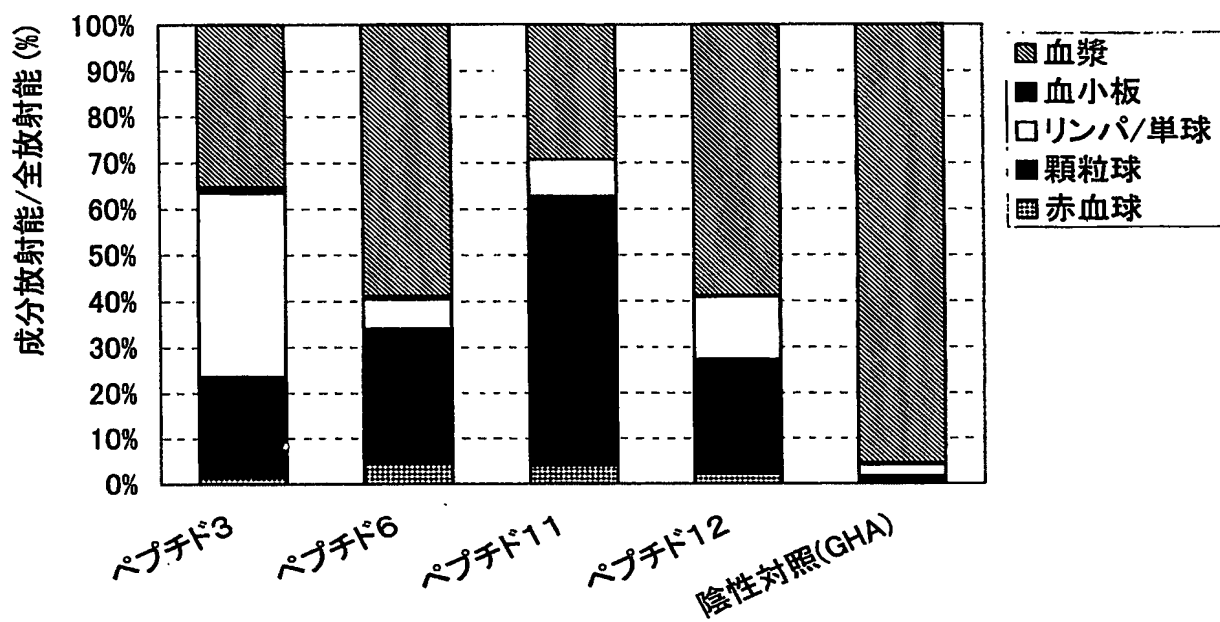
FIG.17



正常ラットにおける T c - 9 9 m - ペプチドの小腸への代謝の経時変化を示す図

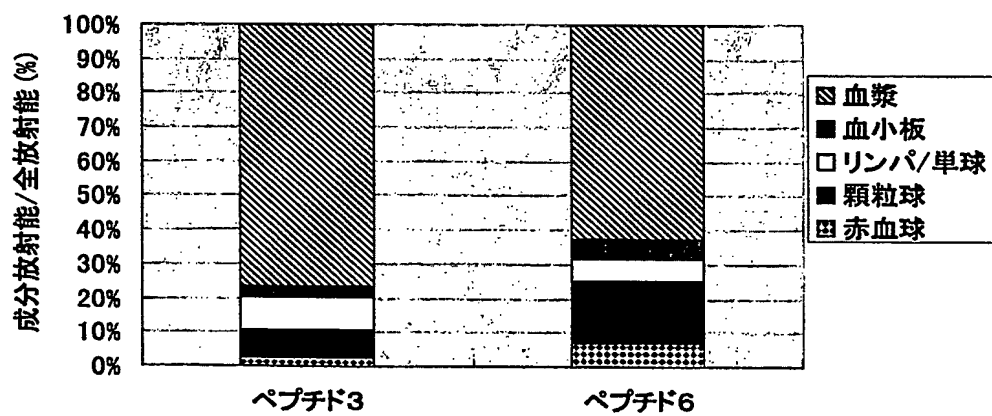
13/21

FIG. 18



Tc-99m-ペプチドのヒト血液内分布を示す図.

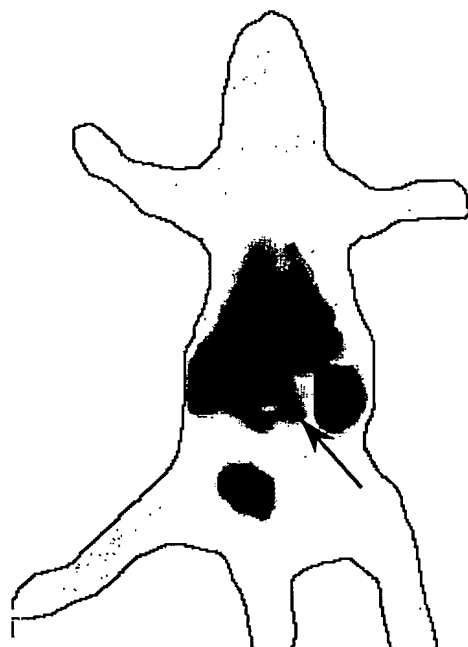
FIG. 19



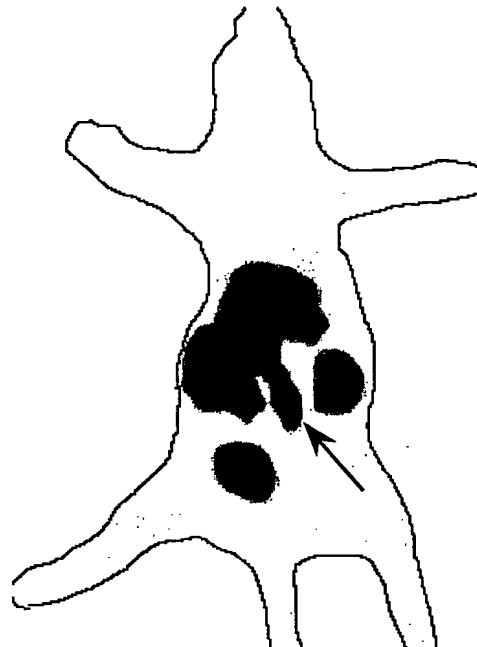
Tc-99m標識ペプチドのラット大腸炎モデル血液内分布

FIG.20

(投与後30分)



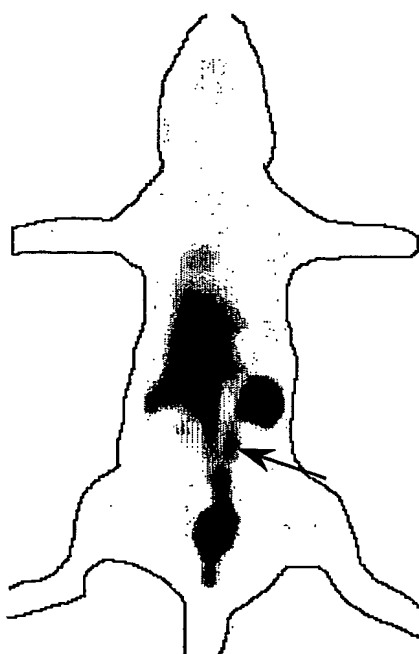
(投与後120分)



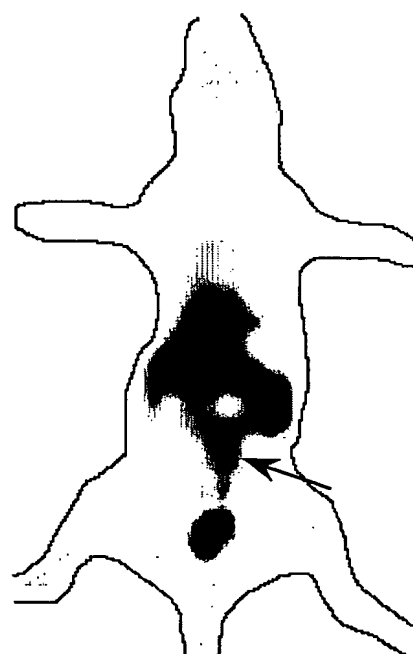
Tc-99m 標識ペプチド3のラット大腸炎モデルにおけるイメージ

FIG.21

(投与後30分)



(投与後120分)

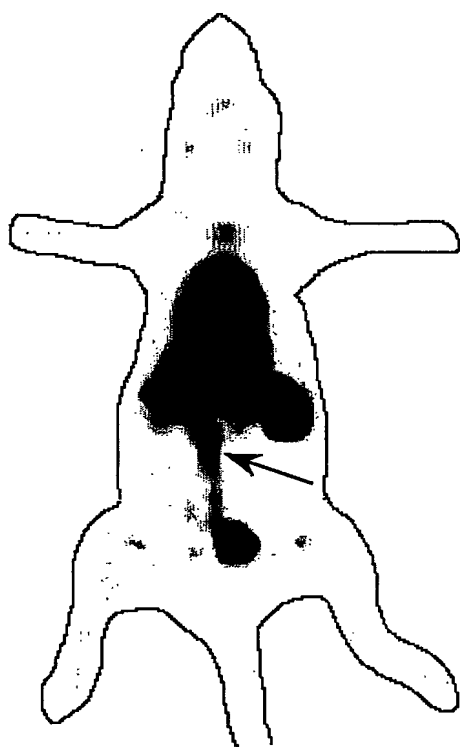


Tc-99m 標識ペプチド6のラット大腸炎モデルにおけるイメージ

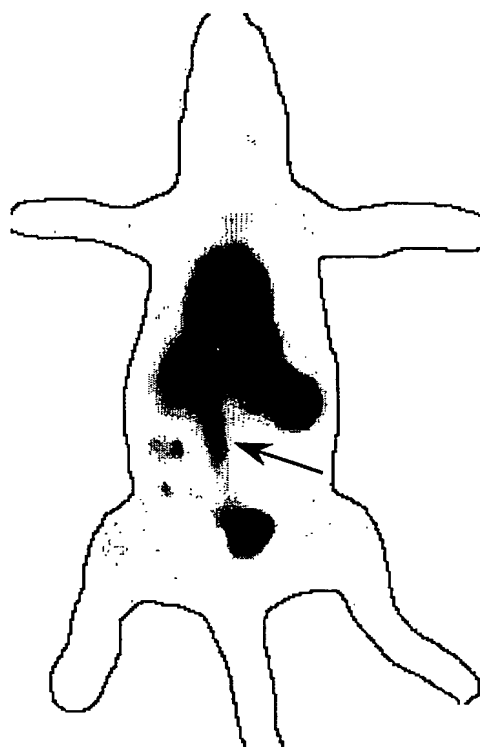


FIG.22

(投与後30分)

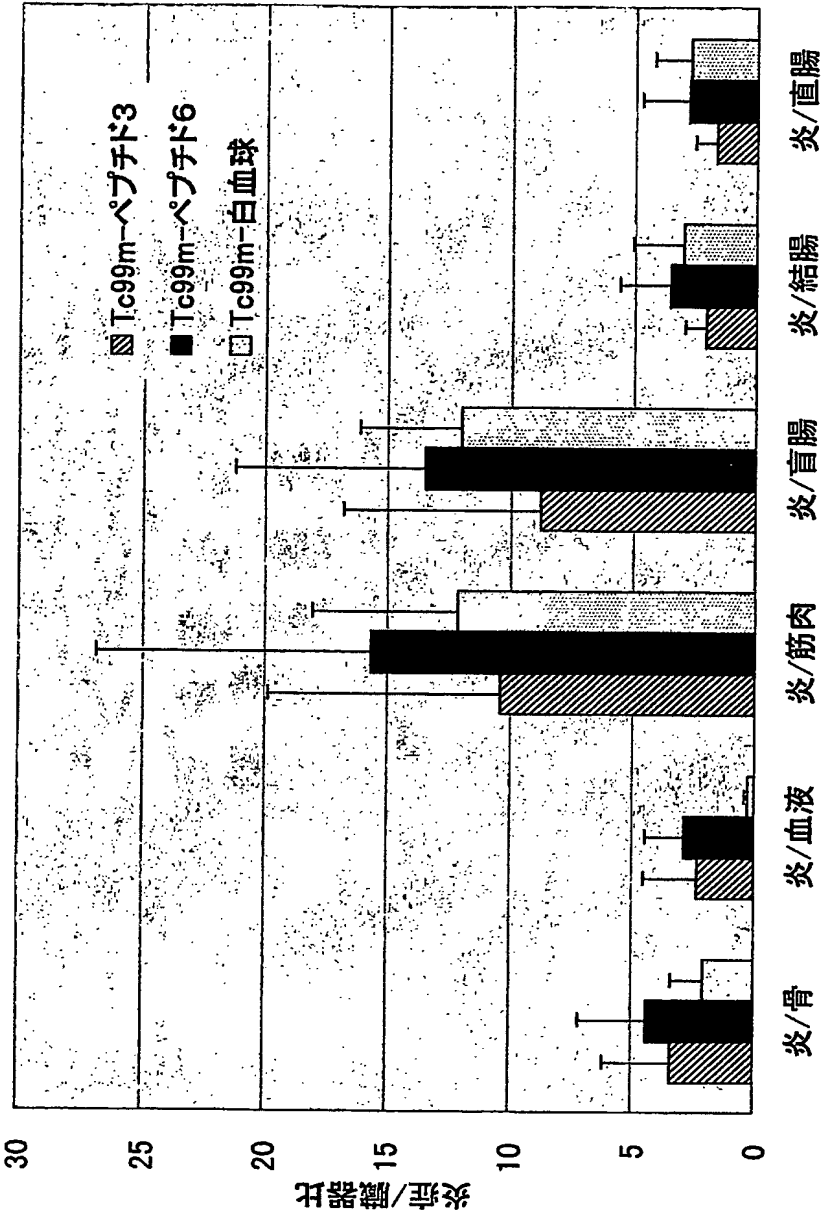


(投与後120分)



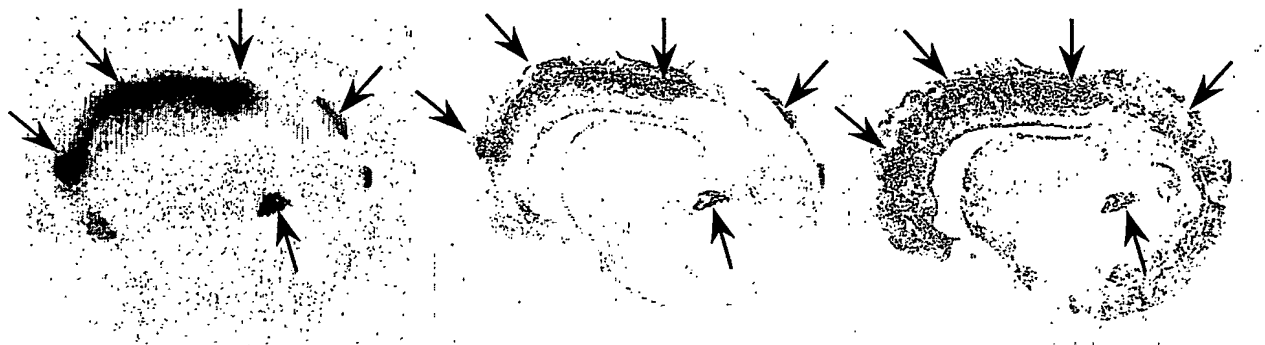
Tc-99m 標識白血球のラット大腸炎モデルにおけるイメージ

FIG. 23



Tc-99 m 標識ペプチドのラット大腸炎モデルにおける炎症/臓器比

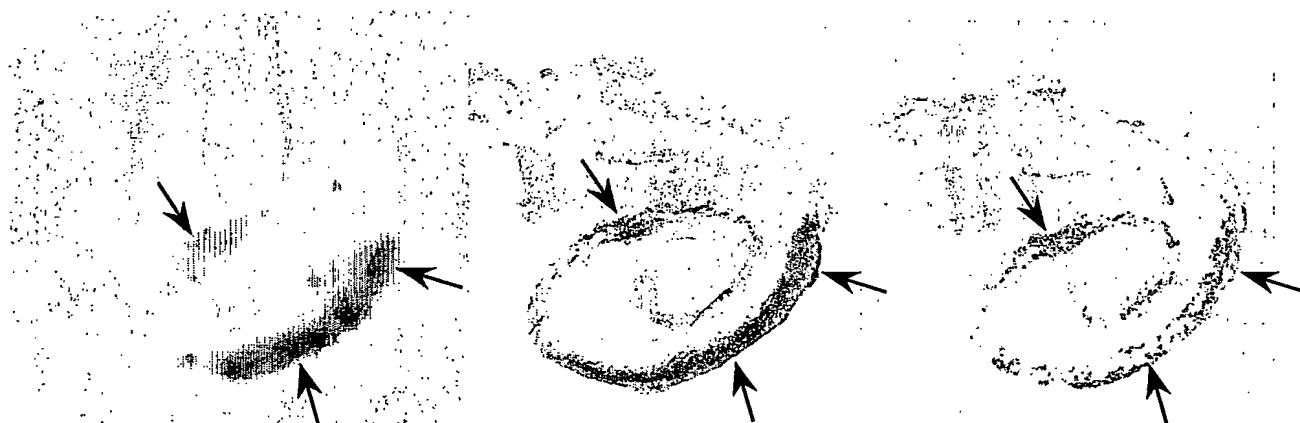
FIG.24



(オートラジオグラフィ) (顆粒球抗体免疫染色) (単球抗体免疫染色)

ラット大腸炎におけるペプチド6のオートラジオグラフィと免疫染色の画像

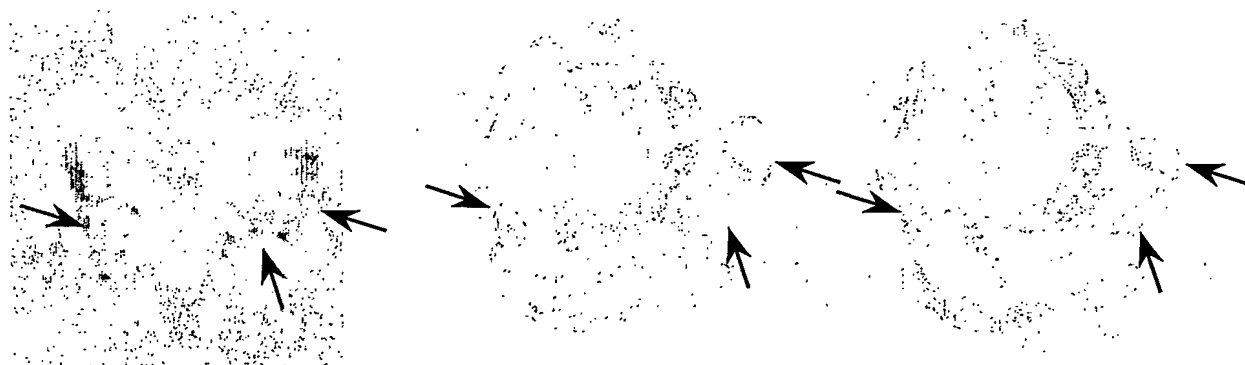
FIG.25



(オートラジオグラフィ) (顆粒球抗体免疫染色) (単球抗体免疫染色)

ラット大腸炎におけるペプチド14のオートラジオグラフィと免疫染色の画像

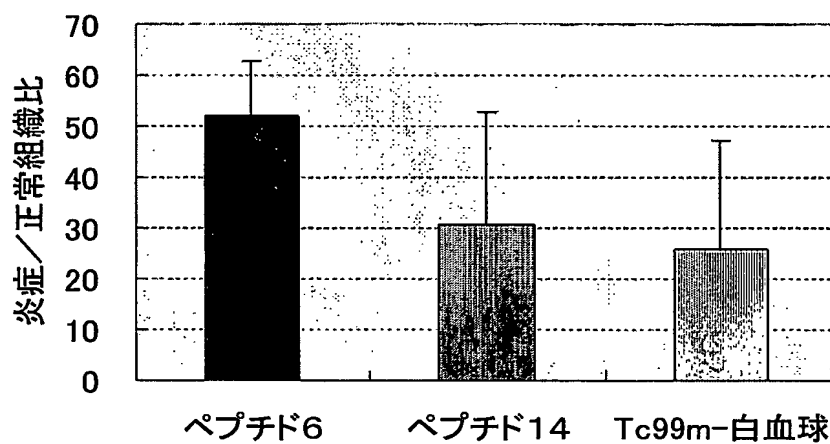
FIG.26



(オートラジオグラフィ) (顆粒球抗体免疫染色) (単球抗体免疫染色)

ラット大腸炎における T c - 9 9 m 標識白血球のオートラジオグラフィと免疫染色の画像

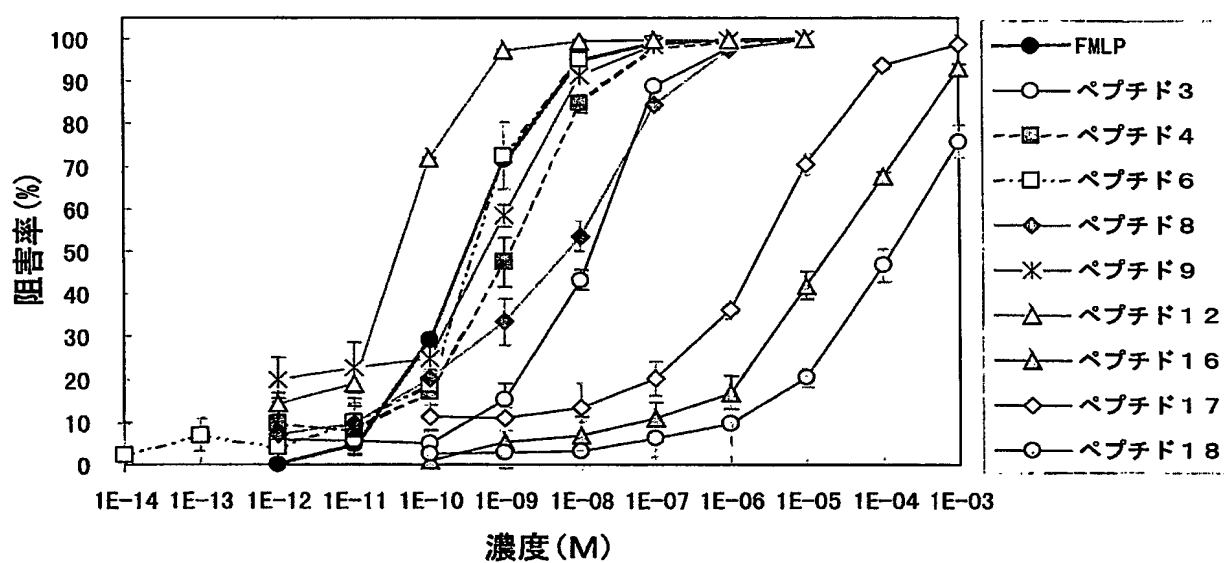
FIG.27



ラット大腸炎における T c 9 9 m 標識ペプチドと T c 9 9 m 標識白血球のオートラジオグラフィの炎症/正常組織比を示すグラフ

19/21

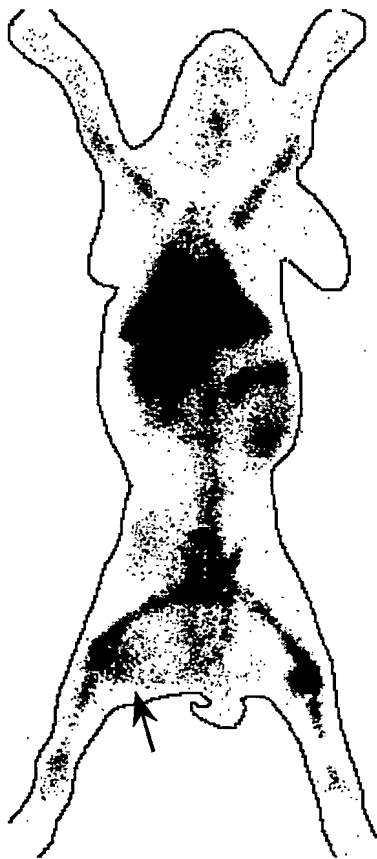
FIG. 28



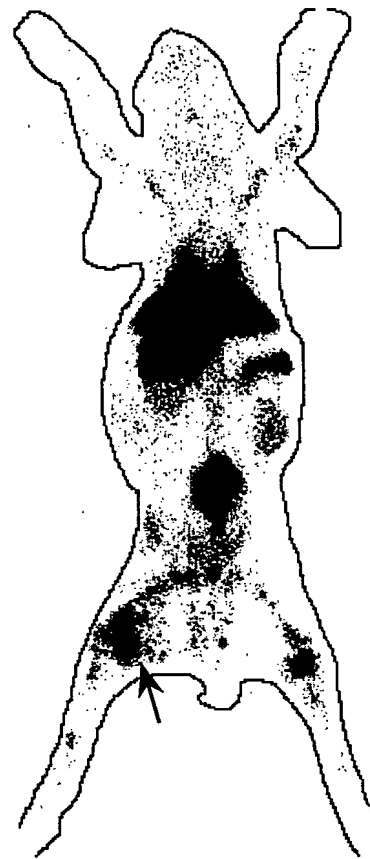
リコンビナントヒト受容体と[3H]-FMLPの結合に対するペプチドの阻害率を示す図

FIG.29

(投与後 2 時間)



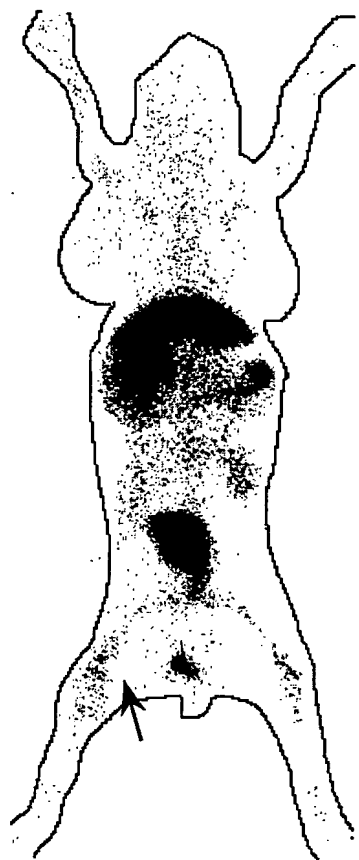
(投与後 5 時間)



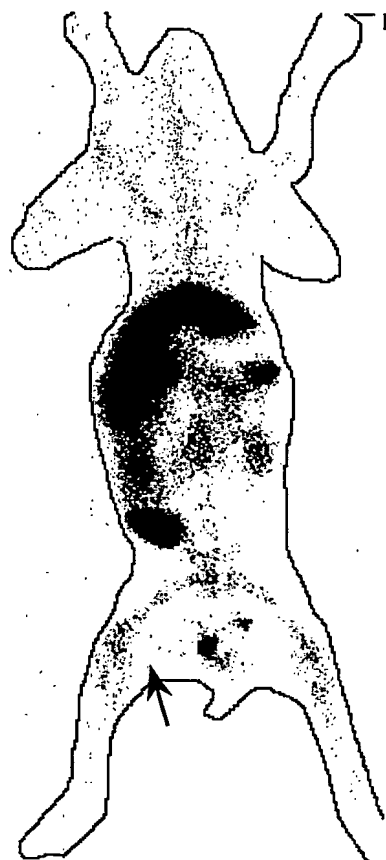
FMLP 阻害無しのウサギ感染症モデルにおける Tc-99m 標識ペプチド 6 のイメージ

FIG.30

(投与後 2 時間)



(投与後 5 時間)



F M L P 阻害有りのウサギ感染症モデルにおける T c - 9 9 m 標識ペプチド 6 のイメージ

## SEQUENCE LISTING

<110> Nihon Medi-Physics Corporation Limited

<120> Leukocyte Binding Compound and Phramacutical Composition  
Containing Labelled Leukocyte Binding Compound

<130> W1229-00

<160> 13

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> FORMYLATION

<222> 1

<200>

<221> AMIDATION

<222> 6

<223> Leukocyte Binding Peptide

<400> 1

Nle Leu Phe Nle Tyr Lys Ser Cys Gly Asn

1

5

10



<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> FORMYLATION

<222> 1

<200>

<221> AMIDATION

<222> 6

<223> Leukocyte Binding Peptide

<400> 2

Nle Leu Phe Nle Tyr Lys Ser Cys Asp Asp

1

5

10

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> FORMYLATION

<222> 1

<200>

<221> AMIDATION

<222> 6

<223> Leukocyte Binding Peptide

<400> 3

Nle Leu Phe Nle Tyr Lys Ser Cys Gly Asp

1 5 10

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> FORMYLATION

<222> 1

<200>

<221> AMIDATION

<222> 6

<223> Leukocyte Binding Peptide

<400> 4

Nle Leu Phe Nle Tyr Lys Ser Arg Asp Cys Asp Asp

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> FORMYLATION

<222> 1

<200>

<221> AMIDATION

<222> 6

<200>

<221> BLOCKED

<222> 7

<223> Leukocyte Binding Peptide

<400> 5

Nle Leu Phe Nle Tyr Lys Ser

1

5

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> FORMYLATION

<222> 1

<200>

<221> AMIDATION

<222> 6

<220>

<221> BLOCKED

<222> 11

<223> Leukocyte Binding Peptide

<400> 6

Nle Leu Phe Lys Ser Ser Asn Arg Cys Asp Asp

1

5

10

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> FORMYLATION

<222> 1

<200>

<221> AMIDATION

<222> 6

<220>

<221> BLOCKED

<222> 8

<223> Leukocyte Binding Peptide

<400> 7

Nle Leu Phe Nle Tyr Lys Ser Arg

1

5

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> FORMYLATION

<222> 1

<200>

<221> AMIDATION

<222> 6

<220>

<221> BLOCKED

<222> 7

<223> Leukocyte Binding Peptide

<400> 8

Nle Leu Phe Nle Tyr Lys Ser

1

5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> FORMYLATION

<222> 1

<200>

<221> AMIDATION

<222> 6

<200>

<221> BLOCKED

<222> 9

<223> Leukocyte Binding Peptide

<400> 9

Nle Leu Phe Nle Tyr Lys Ser Arg Asp

1

5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> FORMYLATION

<222> 1

<200>

<221> AMIDATION

<222> 6

<200>

<221> BLOCKED

<222> 9

<223> Leukocyte Binding Peptide

<400> 10

Nle Leu Phe Nle Tyr Lys Ser Ser Asn

1

5

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> ACETYLATION

<222> 1

<200>

<221> AMIDATION

<222> 6

<223> Leukocyte Binding Peptide

<400> 11

Nle Leu Phe Nle Tyr Lys Ser Arg Asp Cys Asp Asp

9 /10

1

5

10

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; BLOCKED

&lt;222&gt; 1

&lt;200&gt;

&lt;221&gt; AMIDATION

&lt;222&gt; 6

&lt;223&gt; Leukocyte Binding Peptide

&lt;400&gt; 12

Nle Leu Phe Nle Tyr Lys Ser Arg Asp Cys Asp Asp

1

5

10

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; METHYLATION

&lt;222&gt; 1



<200>

<221> AMIDATION

<222> 6

<223> Leukocyte Binding Peptide

<400> 13

Nle Leu Phe Nle Tyr Lys Ser Arg Asp Cys Asp Asp

1

5

10

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP03/12362

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> C07K7/02, A61K38/00, A61K49/00, A61K51/00, A61N5/10,  
A61P37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> C07K7/02, A61K38/00, A61K49/00, A61K51/00, A61N5/10,  
A61P37/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
REGISTRY (STN), CA (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS),  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 97/14443 A1 (BRACCO INTERNATIONAL B.V.), 24 April, 1997 (24.04.97), & EP 814849 A1 & JP 10-511701 A	1-13
A	WO 90/10463 A1 (NEORX CORP.), 20 September, 1990 (20.09.90), & EP 463116 A1 & US 4986979 A & JP 4-504129 A	1-13
A	WO 90/13317 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORP.), 15 November, 1990 (15.11.90), & EP 398143 A1 & JP 4-505761 A	1-13
A	WO 95/11045 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORP.), 27 April, 1995 (27.04.95), & EP 732944 A1 & US 5792444 A & JP 9-504526 A	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
27 October, 2003 (27.10.03)Date of mailing of the international search report  
11 November, 2003 (11.11.03)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/12362

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EDWARDS D.S. et al., RP463: a stabilized technetium-99m complex of a hydrazino nicotinamide derivatized chemotactic peptide for infection imaging., Bioconjugate Chemistry 1999, Vol.10, No.5, pages 884 to 891	1-13
A	VERBEKE K. et al., Influence of the bifunctional chelate on the biological behavior of 99mTc-labeled chemotactic peptide conjugates., Nuclear Medicine & Biology 2000, Vol.27, No.8, pages 769 to 779	1-13

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07K 7/02, A61K 38/00, A61K 49/00, A61K 51/00, A61N 5/10, A61P 37/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07K 7/02, A61K 38/00, A61K 49/00, A61K 51/00, A61N 5/10, A61P 37/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY (STN), CA (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS),  
GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 97/14443 A1 (BRACCO INTERNATIONAL B.V.) 1997.04.24 & EP 814849 A1 & JP 10-511701 A	1-13
A	WO 90/10463 A1 (NEORX CORPORATION) 1990.09.20 & EP 463116 A1 & US 4986979 A & JP 4-504129 A	1-13
A	WO 90/13317 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 1990.11.15 & EP 398143 A1 & JP 4-505761 A	1-13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 10. 03

国際調査報告の発送日

11.11.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり

4N

9152

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 95/11045 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 1995. 04. 27 & EP 732944 A1 & US 5792444 A & JP 9-504526 A	1-13
A	EDWARDS D. S. et al, RP463: a stabilized technetium-99m complex of a hydrazino nicotinamide derivatized chemotactic peptide for infection imaging. Bioconjugate Chemistry 1999, Vol. 10, No. 5, p. 884-891	1-13
A	VERBEKE K. et al, Influence of the bifunctional chelate on the biological behavior of 99mTc-labeled chemotactic peptide conjugates. Nuclear Medicine & Biology 2000, Vol. 27, No. 8, p. 769-779.	1-13